

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**BIOKATALÍTIKUS FOLYAMATOK SZINTETIKUS
ALKALMAZÁSA ÉS MECHANIZMUSVIZSGÁLATA**

POPPE LÁSZLÓ

**MTA KÉMIAI KUTATÓKÖZPONT ÉS
BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
SZERVES KÉMIA TANSZÉK**

BUDAPEST, 2000

TARTALOM

1. BEVEZETÉS	1
1.1. BIOKATALÍZIS A SZINTETIKUS KÉMIÁBAN	2
1.1.1. A biokatalizátorok jellemzői	3
1.1.1.1. <i>Biokatalízis sejtmentes enzimkészítményekkel</i>	3
1.1.1.2. <i>Biokatalízis mikroorganizmusokkal</i>	7
1.1.1.3. <i>További, biokatalizátorként ígéretes biológiai rendszerek</i>	8
1.1.2. A biokatalízis szintetikus alkalmazása	9
1.1.2.1. <i>Biokatalízis királis feromonok szintézisében</i>	10
1.1.3. A biokatalízis sztereokémiai vonatkozásai	11
1.1.3.1. <i>Enantiomer szelektív biokatalízis</i>	15
1.1.3.2. <i>Enantiotóp szelektív biokatalízis</i>	16
1.2. BIOKATALÍTIKUS FOLYAMATOK MECHANIZMUSVIZSGÁLATA	18
1.2.1. A fenilalanin ammónia liáz mechanizmusvizsgálata	19
1.2.2. A B ₁₂ -koenzim függő enzimek mechanizmusvizsgálata	20
1.2.2.1. <i>A B₁₂-koenzim és tőle függő enzimek szerepe és jelentősége</i>	21
1.2.2.1. <i>A B₁₂-koenzim függő folyamatok tanulmányozásának módszerei</i>	22
IRODALOM AZ 1. FEJEZETHEZ	26
2. BIOKATALÍTIKUS MÓDSZEREK SZINTETIKUS ALKALMAZÁSA	43
2.1. RACÉM VEGYÜLETEK ENANTIOMER SZELEKTIV ÁTALAKÍTÁSAI	43
2.1.1. Racém citronellál enantiomer szelektív redukciója sűrítőlesztővel	43
2.1.2. Racém 1,2-diolszármazékok enantiomer szelektív reakciói lipázokkal	46
2.1.2.1. <i>Racém 1,2-diol diacetátok enantiomer szelektív hidrolízise</i>	46
2.1.2.2. <i>Racém 1,2-diolok 2-acetátjainak enantiomer szelektív acetilezése</i>	49
2.2. PROKIRÁLIS VEGYÜLETEK ENANTIOTÓP SZELEKTIV ÁTALAKÍTÁSAI	55
2.2.1. Prokirális 3-szubsztituált dietil glutarátok enzimatisz hidrolízise	55
2.2.1.1. <i>A (+)-faranál és a (+)-13-norfaranál szintézise</i>	56
2.2.1.2. <i>A mevinolin naftalin analogonjainak szintézise</i>	60
2.2.2. Prokirális 1,3-diolszármazékok enantiotóp szelektív reakciói	61
2.2.2.1. <i>Védett aldehid funkciót tartalmazó prokirális 1,3-diolok enzimkatalizált acetilezése</i>	61
2.2.2.2. <i>Prokirális 2-aciloxi-1,3-diolok enzimkatalizált acetilezése</i>	64

2.2.3. Prokirális ketonok enantiotóp szelektív redukciója sűrűlélesztővel	68
2.2.3.1. <i>1-Acetoxi-3-ariloxipropán-2-onok enantiotóp szelektív redukciója sűrűlélesztővel</i>	68
2.2.3.2. <i>Dihidroxiaceton származékok enantiotóp szelektív redukciója sűrűlélesztővel</i>	72
IRODALOM AZ 2. FEJEZETHEZ	75
3. BIOKATALÍTIKUS FOLYAMATOK MECHANIZMUSVIZSGÁLATA	79
3.1. A FENILALANIN AMMÓNIA-LIÁZ VIZSGÁLATA	79
3.1.1. L-Fenilalanin analogonok előállítása és vizsgálata PAL enzimmel	81
3.1.2. A fenilalanin ammónia-liáz reakció vizsgálata elméleti számításokkal	83
3.1.2.1. <i>A fenilalanin ammónia-liáz javasolt σ-komplex intermedierjeinek vizsgálata</i>	83
3.1.2.2. <i>A fenilalanin ammónia-liáz homológia modellje</i>	85
3.1.2.3. <i>A PAL mechanizmus összevetése az enzimkinetikai és számítási adatokkal</i>	86
3.2. B₁₂-KOENZIM FÜGGŐ ENZIMEK VIZSGÁLATA	91
3.2.1. A B₁₂-koenzim poszthomolízis intermedier analogonjai	92
3.2.1.1. <i>Mutáz enzimek vizsgálata poszthomolízis intermedier analogonokkal</i>	97
3.2.1.2. <i>Elimináz enzimek vizsgálata poszthomolízis intermedier analogonokkal</i>	98
3.2.1.3. <i>Ribonukleotid trifoszfát reduktáz vizsgálata poszthomolízis intermedier analogonokkal</i>	99
3.2.2. A B₁₂-koenzim 'base-off' analogonja	100
3.2.2.1. <i>Mutáz enzimek vizsgálata a B₁₂-koenzim 'base-off' analogonjával</i>	103
3.2.2.2. <i>Elimináz enzimek vizsgálata a B₁₂-koenzim 'base-off' analogonjával</i>	104
3.2.3. Szubsztrát-korrin típusú B₁₂-koenzim analogonok	104
3.2.3.1. <i>Mutáz enzimek vizsgálata szubsztrát-korrin inhibitorokkal</i>	105
3.2.3.2. <i>Elimináz enzimek vizsgálata szubsztrát-korrin inhibitorokkal</i>	107
3.2.4. B₁₂-függő enzimek szubsztrát-adenozin típusú inhibitorai	108
IRODALOM AZ 3. FEJEZETHEZ	111
KÍSÉRLETI RÉSZ (I - XX. mellékletek)	
ÖSSZEFOGLALÓ CIKK, MONOGRÁFIÁK (A - C. mellékletek)	

1. BEVEZETÉS

Napjainkban az egyik legnagyobb kihívás amivel a szerves kémia szembenéz, a mind nagyobb számú összetett, biológiailag aktív anyag gazdaságos szintézise. Egyre nagyobb az igény a sztereoizomerek - kiemelendően a királis anyagok adott enantiomerjének – tiszta formában történő előállítására ¹⁻⁴. Az egyes enantiomerek eltérő terápiás hatásúak lehetnek ⁵, a köztük lévő különbség megnyilvánulhat felszívódásuk, metabolizmusuk vagy kiürülésük során is ⁶. Érthető tehát, hogy az enantiomerek tiszta elkészítésére alkalmas módszerek fejlesztése egyre inkább központi kérdéssé kezd válni a gyógyszerek, növényvédőszer, sőt a finomkémiai és háztartásvegyipari, élelmiszeripari termékek kutatása, fejlesztése és gyártása terén is.

Erre válaszul a szintetikus szerves kémia eszköztára napjainkban hatalmas fejlődésnek indult; többek között a fémorganikus vegyületek alkalmazása, a heterogén és homogén fém- és nehézfém-katalízis, az elektro- és fotokémiai technikák, a fázis-transzfer katalízis, szupramolekuláris kémiai módszerek, a szilárd hordozón végzett reakciók gazdagítják a sztereoszelektív szintézismódszerek fegyvertárát.

A királis szintézismódszerek iránti megnövekedett igény és a környezetvédelmi kérdések fokozatos előtérbe kerülése könnyen érthetővé teszi ezen kémiai módszerek mellett a biokatalitikus eljárások iránti érdeklődés robbanásszerű fejlődését mind laboratóriumi, mind ipari méretekben. A biokatalízis, biotranszformáció céljaira felhasználható rendszerek (elsősorban enzimek, mikroorganizmusok) számos előnyös sajátossággal bírnak. A biokatalizátorok előnyös vonása lehet szelektivitásuk és hatékonyságuk. Majdnem minden kémiai reakciónak megtalálható az enzimatis megfelelője, a biokatalízis felhasználási területe így kevésbé korlátozott. Az enzimek természetüknél fogva környezetbarát, királis katalizátorok, sok esetben elkerülhető velük a mérgező, vagy a környezetet súlyosan terhelő melléktermékek képződése ⁷.

A biológiai rendszerek - köztük az enzimkatalizált folyamatok - molekuláris szintű megismerése ugyancsak robbanásszerű fejlődésnek indult. Ez a fejlődés köszönhető a molekuláris genetika (genetikai szekvenciák meghatározása, PCR, génexpresszió, "site-directed mutagenesis"...), a biológiai rendszerek szerkezetkutatása (fehérjekrisztallográfia, biomolekulák oldatfázisú szerkezetmeghatározása NMR technikákkal, XAFS, ESR, Raman, mikroszkóp technikák...) és a bioinformatika (megjelenítés, modellezés pl. homológiamodellekkel, ligandumillesztés, kevert módú kvantumkémia számítások fehérjéken belül, gén és protein adatbázisok...) egyre fejlődő és bővülő módszereinek. Ezek az új

technikák hatékony eszközöket adnak a kutatók kezébe az enzimkatalizált folyamatok mechanizmusának mind részletesebb megismeréséhez. A biokatalitikus folyamatok működésének ilyen szintű megismerése visszahat a szintetikus módszerekre, mivel a biokatalizátorok, biokatalitikus folyamatok fejlesztése mindinkább célzottá és tervezhetővé válik ⁸.

Az új szintetikus eljárások kifejlesztése során tehát a biokatalizátorokat ugyanúgy kell kezelni, mint bármelyik másik új reagenst vagy katalizátort. Ha egy folyamatnak létezik mind kémiai, mind biokatalitikus alternatívája, az egyik vagy másik módszer mellett szóló döntésnek szigorú költség-haszon számításokon kell alapulnia. A mai korszerű többlépéses szintetikus eljárások ilyen elvek alapján ötvözik az összes új, hatékony szintetikus módszereket, közöttük a biokatalízist.

1.1. BIOKATALÍZIS A SZINTETIKUS KÉMIÁBAN

A kémiai rezolválás ^{9,10} illetve kémiai sztereoszelektív szintézisek ¹¹⁻²¹ jól megalapozott módszereket és reagenseket adnak a szintetikus kémiával foglalkozó vegyészek kezébe.

Számos enzim és sejt rendszer már ugyancsak elérte ezt a „*reagens*” állapotot, a szintetikus kémikusok úgy kezelik őket, mint bármely más modern szintetikus eszközt. A legfontosabb „*reagens*” állapotot elért rendszerek közé az izolált enzimek közül elsősorban hidrolázok, oxido-reduktázok és liázok, a mikroorganizmusok közül pedig a sütőélesztő tartozik. Ezekről a szintetikus biokatalízisre felhasználható rendszerekről mára igen széleskörű információ áll rendelkezésünkre ²²⁻³⁸.

A szerves kémiában jelenleg használt enzimek jelentős része kereskedelmi termék, sok közülük rögzített formában is elérhető ³⁹. Könnyen felhasználható mikroorganizmusok is beszerezhetőek nagy tételben, ezek rögzítésére is számos módszer ismert. A kereskedelmi törzsgyűjtemények a ritkábban használt mikroorganizmusok gazdag tárházát jelentik. A biotechnológia és a génsebészet szakadatlanul fejlődő módszerei egyre nagyobb lehetőségeket nyújtanak módosított, vagy akár teljesen új enzimek előállítására.

A szélsőséges körülmények közt élő szervezetekből nyerhető „*extremozimek*” ⁴⁰⁻⁴² kutatása, a kombinatorikus biokatalízis ^{43,44}, az ipari enzimek optimalizálására felhasznált célzott evolúció ⁴⁵, vagy a kísérletes az enantioszelektivitás molekulamodellezéssel történő modellezése ⁴⁶ a biokatalízis ígéretes fejlesztési területei.

1.1.1. A biokatalizátorok jellemzői

A biotranszformációkban (ezek abban különböznek a *de novo* fermentációs folyamatoktól, hogy bennük egy adott szintetikus vagy természetes szubsztrát átalakítása zajlik) részt vevő biokatalizátorok számos típusa létezik, melyek különböző formákban, különböző körülmények között működhetnek (1. Táblázat).

1. Táblázat Biokatalizátorok típusai

Egész sejtek	Sejtmentes készítmények
Állapot <ul style="list-style-type: none"> • Növekvő sejtek • Nyugvó sejtek • Liofilizált sejtek • Módosított/kezelt sejtek 	Állapot <ul style="list-style-type: none"> • Sejtmentes extrakt • Tisztított enzimek • Módosított/kezelt enzimek • Multienzim rendszerek
Forma <ul style="list-style-type: none"> • Szabad sejtek • Mikrokapszula/mikroemulzió • Rögzített sejtek 	Forma <ul style="list-style-type: none"> • Szabad forma • Mikrokapszula/mikroemulzió • Rögzített forma
Környezet <ul style="list-style-type: none"> • Vizes oldat • Vizes oldat segédoldószerrel • Vizes – szerves kétfázisú rendszer • Szerves oldószer 	Környezet <ul style="list-style-type: none"> • Vizes oldat • Vizes oldat segédoldószerrel • Vizes – szerves kétfázisú rendszer • Szerves oldószer
További ígéretes biokatalizátorok <ul style="list-style-type: none"> • Géntechnológiai úton módosított enzimek • Félszintetikus, szintetikus enzimek • Katalitikus antitestek • Katalitikus RNS 	

1.1.1.1 Biokatalízis sejtmentes enzimkészítményekkel

A biotranszformációkban résztvevő biokatalizátorok (enzimek) fő alkotórésze fehérje. A fehérjék egy vagy több fehérjeláncból állnak, melyek természetes aminosavakból álló lineáris polimerek. Ezek az aminosavak - a glicin kivételével – mind királisak, amiből következően a fehérjék is királis felépítésűek. Az aminosavak oldalláncaiban jelen lévő csoportok (amino-, karboxil-, hidroxi-, tio-, stb.) a fehérjét potenciálisan savas, bázikus, nukleofil vagy akár

elektrofil katalízisre is képessé teszik. A szubsztrátok kötődhetnek kémiai, hidrogénhidas kötésekkel, elektrosztatikus és egyéb erőkkel a polipeptid lánc(ok) egy meghatározott helyére, amit aktív centrumnak nevezünk. A szubsztrát és az aktív centrum egymást kiegészítő, komplementer topológiájú.

Az ilyen módon az enzim aktív centrumához kötött szubsztrát átalakítását az aktív centrumban a megfelelő térbeli közelségben elhelyezkedő megfelelő funkciós csoportok végzik*. Az enzim egyik természetes funkciója tehát, hogy a szubsztrátot és a katalízist végző funkciós csoportokat megfelelő térbeli elrendeződésbe és közelségbe hozza. A fehérjének azonban nem csak ez a szerepe, hanem az aktív centrumot körülvevő polipeptid védő funkciót is ellát, a nem kívánt – pl. a vizes oldattal egyébként lejátszódó – mellékreakciókat kizárva ún. "negatív katalízist"⁴⁷ is kifejt.

Az enzimek jelentős része a természetben a sejten belül fejt ki hatását, számos esetben egyéb sejtalkotókkal integrált módon. Példa erre a membránba ágyazott enzimek, melyek inaktívak a membránkomponensek nélkül. Ezek az enzimek környezetükből kiszakítva teljesen elveszíthetik aktivitásukat, így tehát nem használhatóak sejtmentes készítményekként.

Az enzimek, hasonlóan más katalizátorokhoz, a reakciókat az aktiválási energia csökkentésével gyorsítják. Az enzimkatalizált reakciókban az aktiválási energia fő közvetlen forrása - ellentétben a kémiai reakciókkal, ahol az döntően a környezet termikus energiájából származik - az enzimfehérje konformációváltozása. Mivel az enzimek is katalizátorok, tehát a folyamatok termodinamikai egyensúlyát nem változtatják meg, makroszkópikus szinten a végső energia-forrás itt is a környezet termikus állapota, amit az enzim közvetít.

Az enzimkatalizált folyamatok lehetnek kémiaiailag jól megalapozott módszerek alternatívái is, de számos esetben olyan reakciókat is lehetővé tesznek, melyek kémiai úton egyáltalán nem, vagy csak igen nehezen valósíthatóak meg. Az enzimek szintetikus alkalmazásának²²⁻²⁹ mérlegelése előtt néhány jellemző sajátosságukat számba kell venni:

Előnyös tulajdonságaik közé sorolható:

- Közel 3000 enzim ismert⁴⁸⁻⁵⁰, számos közülük kereskedelemről beszerezhető, néhány pedig rögzített formában is hozzáférhető³⁹.
- Az enzimek igen hatékonyan képesek katalizálni reakciók széles körét. Az enzimkatalizált folyamat akár 10-12 nagyságrenddel gyorsabb lehet, mint a nem enzimkatalizált folyamat ugyanazon körülmények között.

* Ezek a funkciós csoportok lehetnek a fehérjét alkotó aminosavak oldalláncaiban, de tartozhatnak a katalízist segítő, nem fehérjetermészetű kofaktorokhoz is.

- Az enzimek viszonylag enyhe körülmények (szobahőmérséklet, semleges pH) között képesek működni. Ez fontos lehet olyan esetekben, mikor a termék érélyesebb körülmények között instabil.
- Az enzimkatalizált folyamatok mind az általuk katalizált reakció típusára, mind a szubsztrát szerkezetére/térszerkezetére nézve igen szelektívek. Az enzimek, mint királis makromolekulák, természetüknél fogva alkalmas aszimmetrikus katalizátorok.
- Néhány enzimkatalizált folyamat alkalmas szerves vegyületek nem aktivált helyeire történő funkciós csoport(ok) kialakítására.
- Az enzimkatalizált folyamat, annak aktivitása, szelektivitása számos tényezővel - mint például a szubsztrát ill. a termék koncentrációja, pH, hőmérséklet, ionerősség, oldószerek és más módosító anyagok – befolyásolható, így tehát kedvező irányba is változtatható.
- Az enzimkatalizált folyamatok alacsony környezeti terhelést jelentenek.

Az enzimkatalizált folyamatok kapcsán azonban említést kell tenni azok potenciális hátrányairól is:

- Természetüknél fogva az enzimek általában vizes közegben működnek. Ez gondot okozhat, ha a szubsztrát vagy a termék oldhatatlan vagy vízre érzékeny. Mivel azonban az enzimek nem csak vizes közegben, hanem akár gyakorlatilag vízmentes szerves közegben⁵¹⁻⁵⁴, gázfázisban⁵⁵ vagy szuperkritikus gázfázisban⁵⁶, fordított micellákban⁵⁷⁻⁶¹ vagy folyadékkristályokkal alkotott emulzióban⁶² is működhetnek, az oldhatósági vagy vízérzékenységi problémák így módon megoldhatóak.
- A tiszta enzimek drágák lehetnek. Ezt gyakran el lehet kerülni viszonylag olcsóbb nyers enzimkészítmények vagy akár egész sejtek alkalmazásával, feltéve, hogy a nyers készítményben visszamaradó szennyezők nem interferálnak a folyamattal. Annak is tudatában kell azonban lenni, hogy a tiszta, proteázoktól mentes készítmények hosszabb élettartamúak lehetnek. Optikailag aktív termékek előállításakor még az is előfordulhat, hogy a szennyező enzimek is képesek lehetnek - akár ellentétes szelektivitással⁶³ - ugyanazt a folyamatot is katalizálni. Ennek megfelelően, a biokatalizátor tisztasági foka is technológiai optimalizálás tárgya lehet. A biokatalizátor rögzítése⁶⁴⁻⁷⁹ csökkentheti a műveleti költségeket, és növelheti annak élettartamát. A rögzítés befolyásolhatja ezen túl a biokatalizátor aktivitását/szelektivitását⁸⁰. Az olcsóbb enzimek előállítására további lehetőséget nyújtanak a biotechnológia és a génsebészet⁸¹⁻⁸⁶ fejlett eszközei is.
- Számos enzim meglehetősen instabil, de élettartamuk bizonyos eszközökkel, mint az előbb említett rögzítés, a proteáz szennyezések eltávolítása, növelhető. Az élettartam

növelése szempontjából fontos az inaktiválódás mikéntjének tanulmányozása ⁸⁷. A stabilitás és a működési paraméterek megváltoztatására alkalmasak lehetnek fizikokémiai ill. kémiai módosítások ⁸⁸, de a szelektivitás és stabilitás hatékonyan befolyásolható génszabványi eszközökkel ⁸⁹⁻⁹¹, pl. "site-directed mutagenesis" segítségével ⁹² is. A szélsőséges körülmények között - magas hőmérséklet, extrém sótartalom, stb. - élő szervezetekből nyerhető "extremozimek" kutatása ⁴⁰⁻⁴² mind több eredményt hoz e téren is.

- Néhány enzim csak a szubsztrátumok szűk körén képes átalakításokat végezni. Biokatalízis szempontjából az ideális enzim az lenne, amelyik nem-természetes szubsztrátok viszonylag széles körénak átalakítására képes, miközben megtartja a természetes szubsztráttal szemben mutatott igen magas szelektivitását. Habár ezek a követelmények egymásnak ellentmondónak látszanak, néhány, főként emlősökből származó enzim mégis meglepően jól megfelel nekik. A mikrobiális enzimek valamivel kisebb szubsztráttoleranciával rendelkeznek, de szélesebb körű választékuk ellensúlyozza ezt.

Az enzimek katalitikus aktivitását a szubsztrát és a termék koncentrációján túl számos tényező befolyásolhatja. Az alapvető kinetikai konstansokat (K_m , V_{max}) számos külső tényező befolyásolhatja:

Hőmérséklet: A biokatalitikus folyamatok sebessége a hőmérséklet függvényében egy maximummal rendelkező görbét ír le. A maximum azonban nem nevezhető hőmérséklet optimumnak, hiszen egy bizonyos hőfok felett a sebesség csökkenésének oka az enzim irreverzibilis denaturálódása. A szelektivitás általában a hőmérséklet csökkenésével nő.

pH: Az enzimkatalizált folyamatok általában a pH függvényében valódi optimummal rendelkező haranggörbével jellemezhetőek, melynek oka, hogy a pH változtatása megváltoztathatja az aktív centrumban megtalálható ionizálható csoportok disszociációs állapotát, vagy az egyéb ionizálható csoportok disszociációs állapotának változása változást idézhet elő az enzim globális konformációjában.

Az *oldószerek* felhasználása vizes közegben segédoldószerként, vizes szerves kétfázisú elegyként, vagy gyakorlatilag vízmentes oldószerként már általánosan elterjedt a szintetikus biokatalízisben ²³⁻³⁸. Itt lehet megemlíteni, hogy vannak olyan szerves oldószerben végrehajtott biotranszformációk, melyek vizes közegben megvalósíthatatlanok ^{93,94}.

Az *ionkörnyezet/ionerősség* ⁹⁵⁻⁹⁷, a *nyomás* ⁹⁸, szintén befolyásolhatja az enzimkatalizált folyamatot. Ezen effektusok felhasználhatók tehát a biokatalitikus folyamat befolyásolására, például a szelektivitás megváltoztatására, növelésére is.

1.1.1.2 Biokatalízis mikroorganizmusokkal

Az izolált enzimekkel végzett folyamatokhoz képest a mikrobiális biotranszformációk néhány további jellegzetességét is meg kell említeni.

- **Hozzáférhetőség/elérhetőség.** Számos mikroorganizmus beszerezhető olcsón, nagymennyiségben, nyugvó sejtömeg formájában, ezek közül elsősorban a sűrítőlesztőt (*Saccharomyces cerevisiae*) kell megemlíteni. Jól definiált, dokumentált biotranszformációkat elvégezni képes törzsek széles választéka érhető el különféle törzsgyűjteményekből. Ebben az esetben azonban már a törzsek szaporításához, tenyésztéséhez és fenntartásához professzionális mikrobiológiai ismeretek és eszközök^{99,100} kellenek. A törzs állandósága és egyszerű kezelhetősége szintén fontos szempont.
- Mivel a mikrobiális biotranszformációk is enzimkatalizált folyamatok, a legtöbb, az izolált enzimek jellemzői közt említett sajátság (enyhe körülmények, szelektivitás, királis katalízis, a folyamat külső paraméterekkel történő befolyásolhatósága) több-kevesebb megszorítással itt is érvényes
- A mikroorganizmusok igen sok enzimet tartalmaznak, melyek közül számos állandóan jelenlevőnek tekinthető, míg mások indukálhatók. *Ennek előnye*, hogy egyféle törzzsel számos reakciótípus valósítható meg (pl. redox reakciók, hidrolízisek, addíciós ill. kondenzációs reakciók). A kofaktorokat igénylő enzimek esetében előny lehet, hogy mind a kofaktor, mind a kofaktor regenerálására alkalmas enzimszisztéma jelen van. A multienzimátikus biotranszformációk esetében az élő, intakt sejtben az összes szükséges enzim többé-kevésbé optimális mennyiségben és körülmények közt található meg. A sejtekben egyszerre jelen levő több enzim *hátránya lehet* viszont, hogy a szubsztrátot esetleg nem csak a kívánt enzim alakítja át, hanem más, nemkívánatos mellékreakciók is lejátszódhatnak. Akár ugyanazt a reakciótípust (pl. karbonil redukció alkohollá) is katalizálhatja több, eltérő vagy akár ellentétes szelektivitású enzim¹⁰¹⁻¹⁰³.
- Fontos szempont lehet a mikroorganizmus élettartama és rögzíthetősége. A rögzített sejtek esetenként nagyobb élettartamúak lehetnek, egyszerűbb termékkinyerést, folyamatos működésű reaktortechnika alkalmazását tehetik lehetővé.
- Sajnos a kívánt biotranszformáció kivitelezésére leginkább alkalmas törzsek kiválasztásához nincsenek aranyszabályok, bár néhány nyers általánosítás tehető¹⁰⁴. Az élesztők leginkább hidrolízisek és karbonil redukciók kivitelezésére alkalmasak, a gombák hidroxilálási folyamatokra használhatóak fel, míg a baktériumok rendelkeznek a legnagyobb oxidatív képességgel, szerves vegyületeket akár széndioxiddá és vízzé

képesek oxidálni. A hidrolízisek, bakteriális oxidációk és hidratálási folyamatok általában gyorsak (néhány óra), az élesztőkkel végzett redukciók általában lassabbak, a gombákkal végzett átalakítások igénylik általában a leghosszabb időt. A legáltalánosabb eljárás az ismert analógiák alapján kiválasztott tiszta törzsek tesztelése (itt a minél közelebbi analógiák fellelése drámaian lerövidítheti a keresést). Ha az ismert törzsek nem hozzák a kívánt eredményt, vagy eleve új törzsek fellelése a cél, természetes forrásokból beszerzett izolátumok (talajból, szélsőséges viszonyoknak - pl. magas hőmérséklet, sókoncentráció - kitett helyekről) tesztelése hozhatja meg a sikert.

1.1.1.3 További, biokatalizátorként ígéretes biológiai rendszerek

Mivel a biokatalizátorként felhasználható újszerű rendszerek irodalma is igen szerteágazó, ezért e területeket is csak szemléltetésképpen, kivonatosan mutatom be.

- Új típusú biotranszformációkat tehetnek lehetővé a multienzimátikus rendszerek, melyeket gyakran *mesterséges sejteknek, ill. mesterséges metabolizmusnak* is neveznek ^{105,106}. Ezek igen hasznosak lehetnek *in vitro* enzimátikus kofaktor regenerálást végző rendszerek ^{107,108} felépítésére. Így tehát az élő rendszerek metabolikus folyamataival analóg mesterséges sejtek hozhatók létre, akár azonos fajból, akár különböző törzsekből származó enzimek felhasználásával.
- *A katalitikus antitestek (abzyme)*. Az állati, vagy emberi szervezet immunrendszere által termelt védekező fehérjék az antitestek. A modern immunkutatások eredményeképpen kifejlődött a monoklonális (t.k. teljesen homogén) antitestek előállítását és manipulálását lehetővé tevő technika ¹⁰⁹⁻¹¹¹. E fejlődés tette lehetővé a biokatalizátorként is igen ígéretes, katalitikus sajátságokkal rendelkező antitestek előállítását és további fejlesztését ¹¹²⁻¹²⁴. E katalitikus antitestek jelentőségét abban láthatjuk, hogy míg a természetben fellelhető enzimek száma néhány százezerre tehető, az immunrendszer antitestek variációinak gyakorlatilag végtelen számban történő előállítására képes ¹²⁵. Így elvileg tehát akár természetes enzimek által nem katalizált folyamatok katalízisére is képes antitestek nyerhetők. A katalitikus antitestek képzésére olyan ún. "haptén" szerkezetet állítanak elő, amely a katalizálni kívánt reakció átmeneti állapotának szerkezeti analogonját tartalmazza egy nagyobb, semleges hordozó-fehérjéhez kötve. A "haptén" ellen képződő antitestek - melyek annak mintegy térbeli komplementerei - között számíthatunk katalitikus sajátságúak megjelenésére is. E folyamatban kombinatórikus antitest könyvtárak is alkalmazhatók ¹²⁶. Katalitikus antitestekkel számos biokatalitikus folyamatot, pl. β -

eliminációt ¹²⁷, redox reakciót ¹²⁸, Diels-Alder cikloaddíciót ¹²⁹ vagy alkil észterek sztereoszelektív hidrolízisét ¹³⁰ valósították meg. Ezen ígéretes sajátságok miatt a technika iránt az ipar is érdeklődik ¹³¹.

- Hasonlóan izgalmas, bár talán még komolyabb kihívásokkal szembenező lehetőség a **katalitikus polinukleotidok** felhasználása. A katalitikus sajátságokkal rendelkező pl. önmaga hasításának katalízisére képes RNS ¹³² mellett már olyan katalitikus RNS szekvenciákat is találtak, amely Diels-Alderáz aktivitással rendelkeznek ¹³³. Folyik e katalitikus polinukleotidok hatás-szerkezet összefüggéseinek vizsgálata ¹³⁴, és felmerült az ún. "**ribozimek**" katalitikus sajátságainak a rák génterápiájában való alkalmazásának a gondolata is ¹³⁵. Katalitikus tulajdonságokat fedeztek fel egyes DNS származékok körében is ^{136,137}.
- Végül meg kell említeni az ún. **irányított evolúció ("directed evolution")** technikáját is ^{138,139}. Ez a módszer egy adott sajátságot valamilyen szinten hordozó enzim kiválasztott sajátságának (ez lehet szelektivitás, stabilitás, savtűrés, stb.) irányított felerősítését célozza. E módszer szerint a kiinduló enzim génállományán kisfokú, véletlenszerű mutációkat hoznak létre (pl. kissé hibás PCR alkalmazásával), az így keletkezett mutánsokat megfelelő gazdaszervezetbe exprimálják és termeltetik, majd az adott sajátságra nézve tesztelik. Az első generáció javult sajátságokkal rendelkező legjobb mutánsait azután újabb mutáció / szelekció ciklusnak lehet alávetni. Mára e módszerrel sok esetben a kiválasztott sajátság több nagyságrenddel történő javulását érték el. E módszer a katalitikus antitestek erőteljes konkurrensé lehet. A katalitikus antitest technikával szemben előny a genetikai és mikrobiológiai háttér megalapozottabb, kiforrottabb technológiája, megtartva a gyakorlatilag végtelen mértékű variabilitásból eredő előnyöket.

1.1.2. A biokatalízis szintetikus alkalmazása

Biokatalitikus eljárásokat számos területen alkalmaznak, így e terület átfogó bemutatása is túlságosan szerteágazó lenne. Ezért e területeket is csak néhány alkalmazás példaértékű megemlítésével mutatom be, egy kisebb fejezetben kiemelve a rovarferomonok sztereoszelektív szintézisét célzó területet, melyben mi is érdekeltek voltunk.

- Különféle **mikroorganizmusokat** hosszabb ideje széles körben alkalmaznak számos hasznos szintetikus termék, mint pl. összetett természetes vegyületek ¹⁴⁰⁻¹⁴³,

szteroidok ^{144,145}, alkaloidok ^{146,147}, aminosavak ¹⁴⁸, nukleotidok és analogonok ^{149,150}, szénhidrátok ¹⁵¹ előállítására.

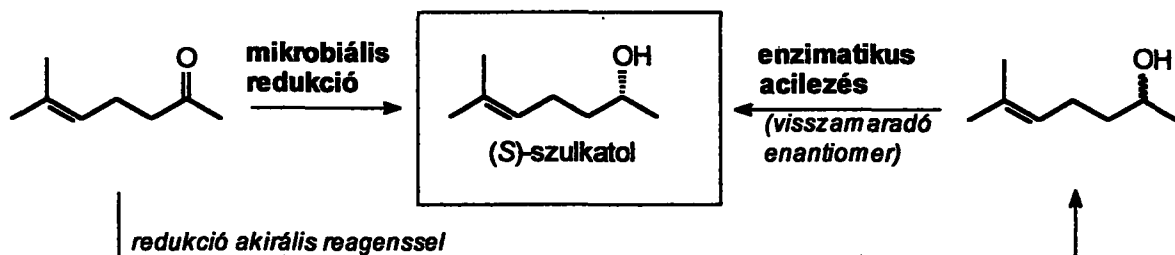
- Változatos ipari léptékű biokatalitikus folyamatokat ¹⁵² oldottak meg *izolált enzimkészítmények* alkalmazásával is, pl. mikrobiális eredetű lipázok ^{153,154}, epoxid hidrolázok ¹⁵⁵ felhasználásával.
- A *biokatalízis további felhasználási területeinek* szemléltetésére megemlíthetjük biodegradábilis termékek lipáz katalizált folyamatokkal történő előállítását ¹⁵⁶, vagy a biokatalízis széleskörű felhasználását élelmiszeripari folyamatokban ^{157,158}.

1.1.2.1. Biokatalízis királis feromonok szintézisében

A feromonok az élővilág információközvetítő anyagai. Az egyik egyed által kibocsájtott kémiai anyag a másik egyedben valamilyen fiziológias választ vált ki. A leggyakoribb a rovarok által termelt ¹⁵⁹ rovarferomonok vizsgálata, mivel ezek felhasználhatóak az integrált növényvédelem korszerű eszközeiként.

A biokatalitikus módszereket sikerrel alkalmazták többek között királis feromonok nagy enantiomertisztaságban történő előállítása során is. Mivel erről a területről részletes áttekintés áll rendelkezésre ¹⁶⁰, ezért itt csak egy kiragadott példát említenék a királis feromonok biokatalitikus eljárásokkal történő számos előállításai közül.

A királis szekunder alkohol feromon, az (S)-szulkatol előállítását biokatalízis segítségével többféle úton is megoldották. A feromont elkészítették mikrobiális úton, a keton prekursor sütőélesztővel végzett redukciójával ¹⁶¹, izolált, termotabil oxidoreduktáz enzimmel végzett redukcióval ¹⁶¹ és a racém alkohol lipáz katalizált acilezésével ¹⁶² is.



Említésre méltó, hogy feromonok aszimmetrikus szintézisére már katalitikus antitestek felhasználását is közölték ¹⁶³.

1.1.3. A biokatalízis sztereokémiai vonatkozásai

Az aszimmetriacentrum létének van't Hoff¹⁶⁴¹⁶⁵ és Le Bel által¹⁶⁶ történt felismerése óta a sztereokémia igen fontos a szelektív reakciók tanulmányozása szempontjából.

A sztereokémia alapfogalmainak még csak rövid leírása is meghaladná egy disszertáció kereteit, ezek tisztázására nagyszerű könyvek álnak rendelkezésre¹⁶⁷⁻¹⁷⁷.

A továbbiakban feltételezem hogy a fent említett művekben részletezett fogalmak ismertek. E fogalmakat közül a legfontosabbakat, úgymint az

- *egyetlen objektumra vonatkozó* fogalmakat: *kiralitás - akiralitás, konstitúció, konfiguráció, konformáció*; továbbá *abszolút konfiguráció - relatív konfiguráció*, vagy a
- *két objektum egymáshoz képesti viszonyát* leíró fogalmakat: az *izoméria*, ezen belül is a *konstitúciós izoméria, sztereoizoméria, a diasztereomerek és az enantiomerek*, valamint
- az *egyzon objektum azonos részei közti viszony* jellemzése (ezekre láthatóak példák az 1. Ábrán): a *homotóp csoportok és oldalak, heterotóp csoportok és oldalak, az enantiotóp ill. diasztereotóp csoportok és oldalak* fogalmai.

csak felsorolásszerűen említem meg.

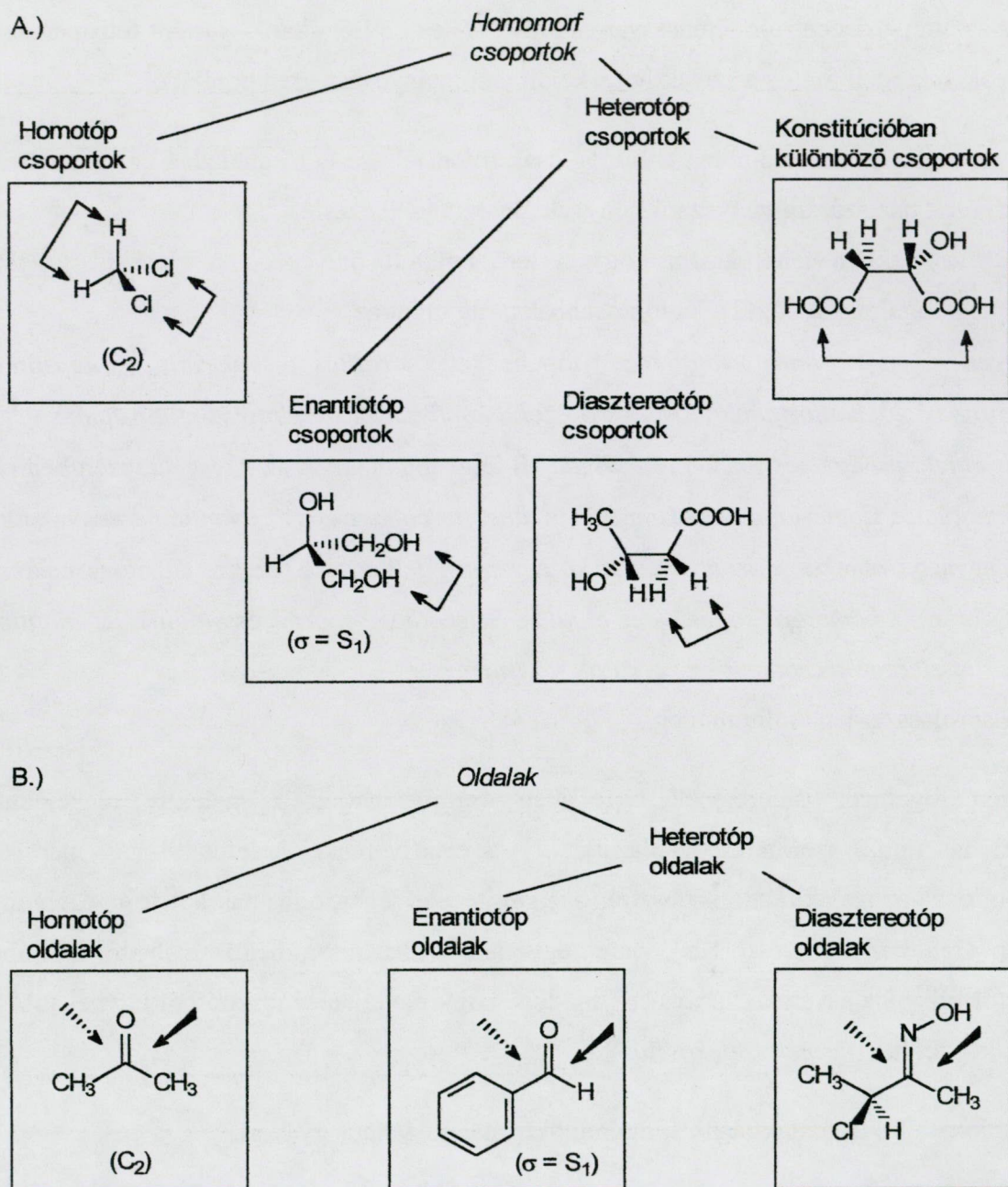
Ezen fogalmak ismeretének birtokában osztályozhatjuk a szelektív reakciókat a szelektivitás típusa szerint (2. Táblázat)²⁴. A szelektív reakciók lefutását nagymértékben meghatározza az átalakítandó szubsztrát(ok) szerkezete: lejátszódhatnak két vagy több anyag elegyén (*szubsztrát szelektivitás*), vagy egyetlen szubsztráton belül található különböző csoportok ill. oldalak átalakításával oly módon, hogy egyetlen szubsztrátból egynél többféle termék képződhet (*termék szelektivitás*)[†].

A biokatalitikus átalakítások során mindkét átalakítástípus gyakori.

[†] E fogalmakat kissé eltérően értelmezik. Egyesek szerint [Prelog, V., *Pure Appl. Chem.*, 1964, 9, 119.] "*termék sztereospecifikus*" a folyamat, ha a reakció során új aszimmetriacentrum képződik, míg "*szubsztrát sztereospecifitás*" esetében diasztereomerek ill. enantiomerek szelektív transzformációja játszódik le.

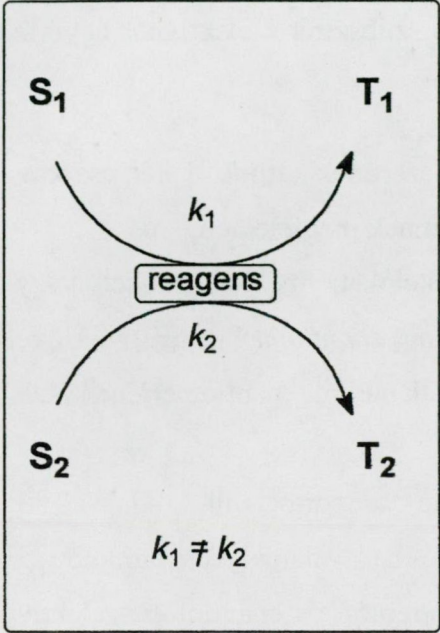
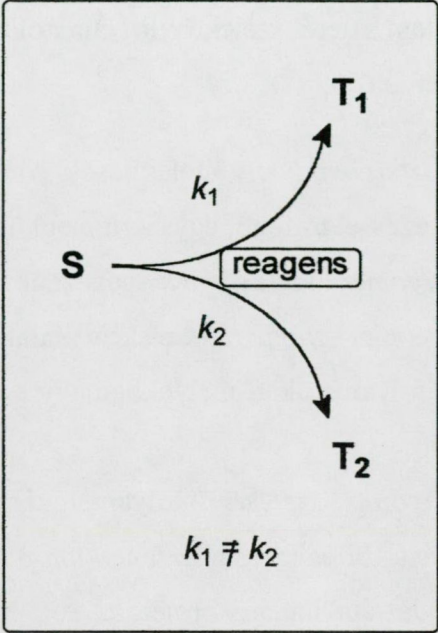
Ettől kissé eltérő értelmezés szerint [Nógrádi, M., *Stereoselective Synthesis*, VCH: Weinheim, 1986.] "*szubsztrát szelektív*" egy reagens, ha különböző szubsztrátokat azonos körülmények között eltérő sebességgel alakít át, míg "*termék szelektív*" egy reakció, amelyben egyetlen szubsztrátból többféle termék képződhet, és a képződött termékek aránya eltér statisztikai képződési arányuktól. Mi e fogalmakat az utóbbi értelemben használjuk.





1. Ábra Tetragonális és trigonális centrumok topológiája ²⁴. Csoportok (A.) és oldalak (B.) topicitása.

2. Táblázat A szelektivitások típusainak osztályzása

SZUBSZTRÁT SZELEKTIVITÁS	TERMÉK SZELEKTIVITÁS		
 <p>Diagram illustrating substrate selectivity: Two substrates, S_1 and S_2, react with a reagent (labeled "reagens") to form products T_1 and T_2. The reaction rates are k_1 and k_2 respectively, with $k_1 \neq k_2$.</p>	 <p>Diagram illustrating product selectivity: A single substrate S reacts with a reagent (labeled "reagens") to form two products, T_1 and T_2. The reaction rates are k_1 and k_2 respectively, with $k_1 \neq k_2$.</p>		
<p align="center">KEMOSZELEKTIVITÁS</p> <p align="center"><i>olyan csoportok megkülönböztetése, melyek konstitúciójukban különböznek de kémiaailag igen hasonlóan viselkednek</i></p>			
<p align="center">REGIOSZELEKTIVITÁS</p> <table border="1"> <tr> <td data-bbox="87 1336 722 1451"><i>konstitúciós izomerek megkülönböztetése</i></td><td data-bbox="722 1336 1351 1451"><i>azonos, de egy molekulán belül eltérő konstitúciójú helyre kapcsolódó csoportok</i></td></tr> </table>		<i>konstitúciós izomerek megkülönböztetése</i>	<i>azonos, de egy molekulán belül eltérő konstitúciójú helyre kapcsolódó csoportok</i>
<i>konstitúciós izomerek megkülönböztetése</i>	<i>azonos, de egy molekulán belül eltérő konstitúciójú helyre kapcsolódó csoportok</i>		
<p>DIASZTEREOMER SZELEKTIVITÁS</p> <p><i>diasztereomerek megkülönböztetése</i></p>	<p>DIASZTEREOTÓP SZELEKTIVITÁS</p> <p><i>diasztereotóp csoportok vagy felületek megkülönböztetése</i></p>		
<p>ENANTIOMER SZELEKTIVITÁS</p> <p><i>enantiomerek megkülönböztetése</i></p>	<p>ENANTIOTÓP SZELEKTIVITÁS</p> <p><i>enantiotóp csoportok vagy felületek megkülönböztetése</i></p>		

A *kemoszelektivitás* fogalmára nincs egyértelmű meghatározás[‡].

A *regioszelektivitás* jobban értelmezhető, általában azt értjük alatta, ha egy folyamatban, melyben több konstitúciós izomer képződhet, valamelyik izomer képződése preferált.

E nem sztereoszelektív folyamatokban a termék és szubsztrát szelektivitás egyértelműen elkülöníthető.

A *sztereoszelektív* átalakítások során azonban célszerűnek tartjuk a két csoport külön megnevezéssel történő, egyszerű megkülönböztetését. Ennek megfelelően:

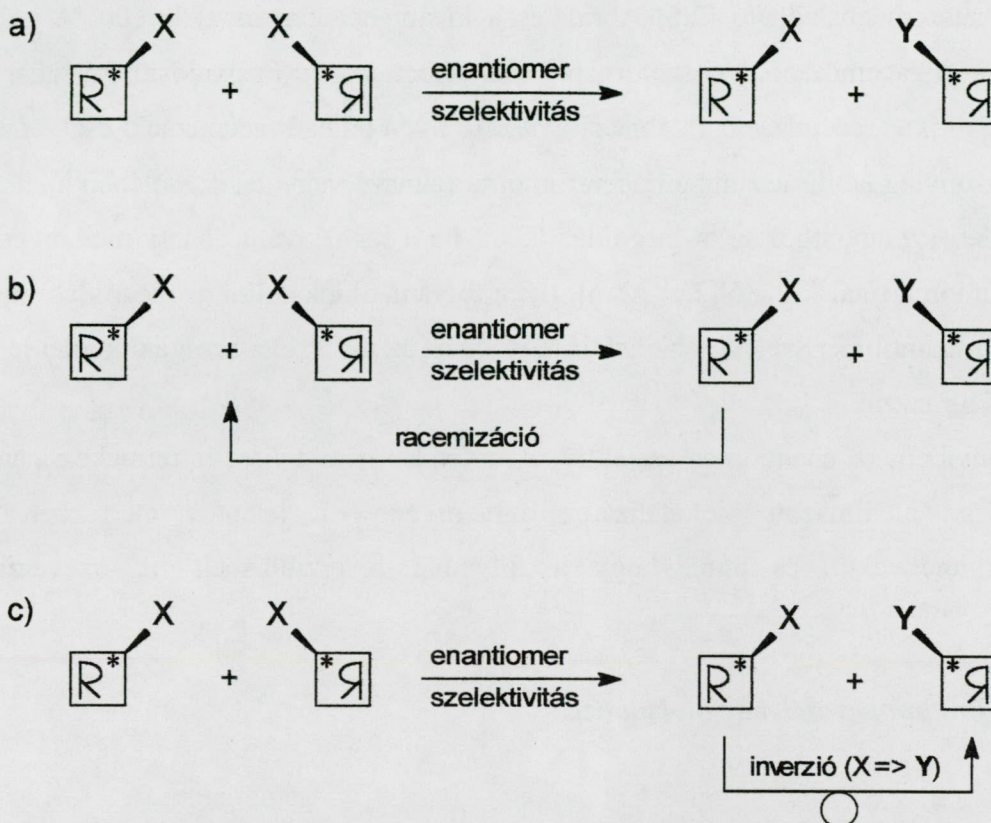
Diasztereomer szelektívnek nevezzük azokat a reakciókat, melyekben két vagy több diasztereomer szubsztrát szelektív átalakítása történik, míg *enantiomer szelektív* jelzővel látjuk el azon folyamatokat, melyekben egy enantiomer pár valamelyik enantiomerjének átalakítása preferált.

Diasztereotóp szelektív folyamatokban diasztereotóp csoportok ill. oldalak szelektív átalakítása történik, míg az *enantiotóp szelektív* reakciókban valamelyik enantiotóp csoport, vagy oldal átalakulása preferált. Sok esetben a diasztereotóp és enantiotóp szelektivitást a prokíralis egység természete szerint is tovább osztályozzák és amennyiben a prokíralitás trigonális egységekhez kapcsolódik, a "*diastereoface*" és "*enantioface selectivity*" meghatározást alkalmazzák. Mi a továbbiakban csak az általánosabb - diasztereotóp és enantiotóp szelektivitás - fogalmakat használjuk.

A biokatalitikus folyamatokban mind a szelektivitások tiszta fellépése, mind pedig a különféle szelektivitások egyidejű megnyilvánulása (pl. regioszelektivitás és enantiotóp szelektivitás egymás mellett) lehetséges.

Mivel a királis vegyületek tiszta enantiomer formájában történő előállítása szempontjából az *enantiomer szelektivitás* és az *enantiotóp szelektivitás* a két legfontosabb szelektivitás típus, a továbbiakban csak az ezekkel összefüggő kérdéseket tárgyaljuk.

[‡] "*Kemospecifikus*" [Trost, B. M.; Salzmann, T. M.; Hirdi, K., *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, 98, 4887.]: "egy olyan reakció, amely egy szerkezeti egységre nézve specifikus, olyan más szerkezeti elemek jelenlétében, melyek legalább annyira, vagy még reaktívabbnak tűnnek".

1.1.3.1. *Enantiomer szelektív biokatalízis*

2. Ábra Enantiomer szelektivitás: a) egyszerű kinetikus rezolválás; b) enantiomer szelektív folyamat racemizációval és a visszamaradó enantiomer visszaforgatásával; c) enantiomer szelektív folyamat, a visszamaradó enantiomer átalakítása a terméké inverziót tartalmazó eljárással

A biokatalízis tiszta enantiomereket eredményező egyik leggyakoribb alkalmazásakor azt használják ki, hogy a biokatalizátor egy enantiomer pár esetében képes lehet az egyik enantiomer szelektív átalakítására (2. Ábra).

Ha a folyamat szelektivitása teljes §, akkor a reakció a racém szubsztrátra vonatkoztatott 50 % konverzió esetén (ami t.k. a reagálni képes enantiomer teljes felhasználását jelenti) leáll. Ekkor mind a termék, mind a visszamaradó szubsztrát enantiomer tiszta. Ennek megfelelően ebben a folyamatban egy adott tiszta enantiomernek a racém szubsztrátra vonatkoztatva a legmagasabb elméleti termelése 50 % [2.a) Ábra].

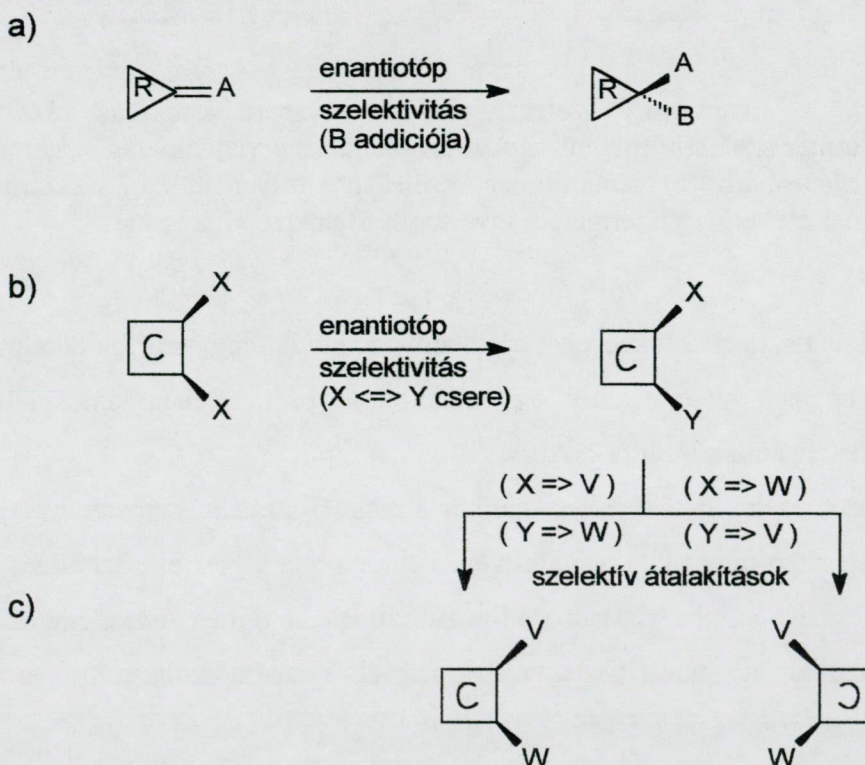
§ A "sztereospecifikus" fogalom nem egyértelmű használata [1.) adott sztereoizomer szubsztrátból kizárólagosan egy adott izomer termék képződése; ill. 2.) a kizárólagos ill. igen nagyfokú szelektivitás jelölése] miatt e fogalom alkalmazását mellőzzük, és a folyamatokat kizárólag szelektívnek nevezzük.

A gyakorlatban általában az egyik enantiomer termék előállítása a kívánatos. Ha a nemkívánatos enantiomer forma racemizációja és visszaforgatása megoldható, az 50 %-os termelési határ meghaladható [2.b) Ábra], és a kívánt enantiomer akár 100 % termeléssel előállítható. A racemizáció / visszaforgatás esetenként *in situ* megvalósítható, akár kémiai, akár biokatalitikus racemizáció alkalmazásával. Az ilyen jellegű racemizáció esélyei általában az egy, viszonylag labilis aszimmetriacentrumot tartalmazó vegyületek esetében jók.

Műveleti szempontból az is megoldás lehet, ha a nem kívánt enantiomer inverzióval a kívánt enantiomerré alakítható [2.c) Ábra]. Ilyen folyamat biokatalitikus megoldása igen ritka, általában az enantiomer szelektív biokatalitikus lépést az inverzióra szolgáló kémiai lépésekkel ötvözve alkalmazzák.

Amennyiben az enantiomer szelektivitás mértéke nem teljes, a termékek enantiomer tisztasága az alkalmazott biokatalizátor milyenségén túl jelentős mértékben függ a reakciókörülményektől és attól, hogy a folyamat reverzibilisnek ill. irreverzibilisnek tekinthető-e^{101, 178-180}.

1.1.3.2. Enantiotóp szelektív biokatalízis

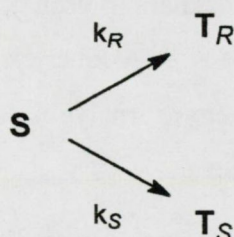


3. Ábra Enantiotóp szelektivitás: a) enantiotóp oldalak megkülönböztetése; b) enantiotóp csoportok megkülönböztetése; c) a királis termék átalakítása kemoselektív reakciókkal egy kívánt célvegyület mindkét enantiomer formájává.

Enantiotóp szelektív folyamatokban (3. Ábra) egy prokirális (v. *mezo*) vegyület enantiotóp oldalainak [3.a) Ábra] illetve enantiotóp csoportjainak [3.b) Ábra] szelektív átalakítása történik. A folyamat szintetikus szempontból igen kedvező, mivel e reakciók segítségével egy akirális vegyület elvileg teljes mennyiségében enantiomertiszta királis termékké alakítható.

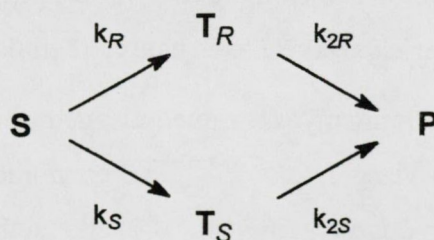
Amennyiben egy fejlettebb termék egy vagy akár mindkét enantiomerjének előállítása a cél, ez alkalmas kemoszelektív reakciók sorrendjének megfelelő változtatásával megoldható lehet [3.c) Ábra].

A legegyszerűbb eset, ha a folyamat irreverzibilisnek tekinthető, és a termékek (T_R ill. T_S) nem alakulhatnak tovább (pl. prokirális dikarbonsav észterek hidrolízise¹⁷⁸).



Ekkor a folyamat szelektivitását és így a termék enantiomertisztaságát a két folyamat sebességi állandóinak (k_R ill. k_S) aránya szabja meg. Ebben az esetben a termék enantiomerösszetétele független a konverziótól.

A kép sokkal összetettebb, még irreverzibilis reakciók esetében is, ha az enantiotóp szelektivitás nem teljes, és a termékek (T) képesek továbbalakulni (pl. egy prokirális diészterből képződő monoészter további hidrolízise¹⁸¹).



Ebben az esetben az első reakciólépésben az enantiotóp csoportok közül az egyik gyorsabban alakul át (pl. $k_{1R} > k_{1S}$). A második lépésben ekkor a termékek (T_R ill. T_S) közül az alakul át gyorsabban, amelyikében a biokatalizátor a kedvező térbeli helyzetű csoportot alakíthatja át (ezért érhetően $k_{2R} < k_{2S}$). Ebből következik, hogy ilyen folyamatok esetén a köztes termék (T) enantiomertisztasága a konverzió növelésével a termelés rovására javítható.

1.2. *BIOKATALÍTIKUS FOLYAMATOK MECHANIZMUSVIZSGÁLATA*

A biokatalitikus folyamatok alkalmazásának fejlődéséhez nagymértékben hozzájárult és a további fejlődés motorja lehet a biokatalitikus folyamatok mechanizmusának molekuláris szintű megismerése.

A fehérjék szerkezetének ¹⁸²⁻¹⁸⁴, térbeli struktúráldásuk mikéntjének ¹⁸⁵ megismerése nagymértékben elősegíti az általuk végzett folyamatok mechanizmusának felderítését. Ennek nagy jelentősége van a receptorok szerkezetének ¹⁸⁶ és ligandumaikkal való kölcsönhatásaik ^{187,188} megismerésével a gyógyszerek hatásmechanizmusának felderítésében, gyógyszer-tervezésben, egyes betegségek jobb megértésében ¹⁸⁹. A fehérjék szerkezetének megismerése ezeken túl nem utolsósorban a biokatalízis egyre mélyebb szintű megértésében és így terevezhetőségben jut ugyancsak fontos szerephez.

A fehérjék struktúráldásának tanulmányozására egyre korszerűbb módszerek állnak rendelkezésre, a protein-krisztallográfia ^{190,191}, az oldatfázisban felhasznált spektroszkópiai módszerek ¹⁹², mint például a cirkuláris dikroizmus (CD) ¹⁹³, vagy a talán leghatékonyabb NMR technikák ^{194,195}.

A korszerű számítási módszerek lehetővé teszik a potenciális ligandumok háromdimenziós szerkezeteit felhasználó, a gyógyszerkutatásban egyre hatékonyabbá váló hatás-szerkezet összefüggés számítások (3D QSAR) ¹⁹⁶ elvégzését vagy a fehérje szerkezetének a genetikai kódból történő előrejelzését, modellezését ¹⁹⁷⁻²⁰¹. A térbeli szerkezet meghatározásán túl fontos a fehérjék szerkezete és hatása közti összefüggés vizsgálata ²⁰²⁻²⁰⁵.

A hatás makroszkópikus tanulmányozása mellett igen fontosak a molekuláris szintű megértést jelentő mechanizmus-vizsgálatok ²⁰⁶⁻²¹¹. Az enzimmechanizmusra a fent említett fehérjeszerkezet vizsgálati módszereken túl következtethetünk, az enzimkatalízis energetikájából ²¹², enzimkinetikai eredményekből ²¹³⁻²¹⁸, illetve izótópjelölt anyagok segítségével ²¹⁹⁻²²¹.

1.2.1. A fenilalanin ammónia liáz mechanizmusvizsgálata

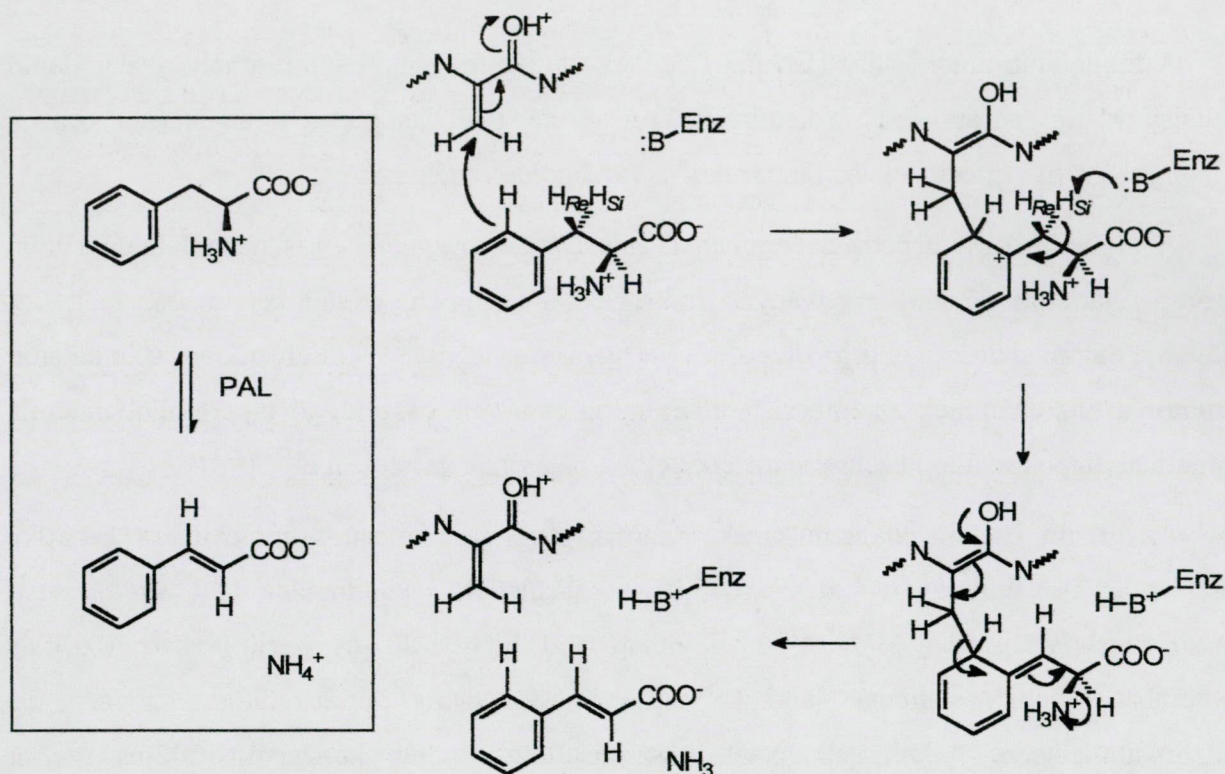
A fenilalanin ammónia liáz (EC 4.3.1.5, PAL) fontos növényi enzim, amely a fenilalanin fahéjsavvá történő átalakulását katalizálja. Az így képződő fahéjsav a ligninek és a számos virág gyönyörű színéért felelős kumarinok és flavonoidok prekursora^{222, 223}.

A többek között a petrezselyemben (*Petroselinum crispum*)²²⁴ is megtalálható enzim szerepet játszhat például a növények mikrobákkal szembeni ellenállóképességében²²⁵. A növényi enzim sikerrel exprimálható mikroorganizmusokba²²⁶⁻²²⁹. Felvetődött a fenilalanin ammónia liáz enzimnek az emberi fenilketonúria és a vele összefüggő hiperfenilalaninémia genetikai alapokon álló kezelésére történő felhasználásának gondolata is^{230, 231}.

Az enzim hatásmechanizmusának tanulmányozására újabban a molekuláris genetika eszközeit is felhasználva új eredmények születtek. Pontmutációk ("Site-directed mutagenesis") segítségével^{228, 229} bizonyítható volt, hogy a 202-es szerin poszttranszlációs reakcióban dehidroalaninná alakul, amely esszenciális proszтетikus csoport az enzimkatalízisben. A génszekvenciák összehasonlítása során konzervált 202-es szerint alaninra vagy glicinre cserélve megszűnik az aktivitás, míg a 202-es cisztein mutáns, melyben a dehidroalanin ugyancsak képződhet, aktívnek bizonyult.

A PAL enzimhez hasonló folyamatot katalizál a hisztidin ammónia liáz (EC 4.3.1.3; HAL, amely a legtöbb sejtben a hisztidin lebontás kezdeti lépését végzi). A bakteriális vagy emlős eredetű HAL és a növényi eredetű vagy gombákból származó PAL enzimek számottevő genetikai hasonlóságot mutatnak²³². A hisztidin ammónia liáz ugyancsak esszenciális proszтетikus csoportként tartalmazza a dihidroalanint^{233, 234}, illetve mint azt ennek az enzimnek az esetében krisztallográfiai eredmények kimutatták²³⁵, az ASG tripeptid részből képződő, elektrofilként működni képes 4-metilénimidazol-5-on (MIO) egységet.

Ezen eredmények és a nagyfokú analógiát mutató hisztidin ammónia liáz mechanizmusvizsgálatával²³⁶⁻²³⁸ nyert adatok alapján fenilalanin ammónia liáz (PAL) mechanizmusára egy a dihidroalanin enzimatiskus elektrofil támadásával kezdődő Friedel-Crafts típusú folyamatot feltételező javaslat született²³⁹ (4. Ábra).



4. Ábra A fenilalanin ammónia liáz javasolt reakciómechanizmusa

1.2.2. A B_{12} -koenzim függő enzimek mechanizmusvizsgálata

A B_{12} -vitamin koenzim származékai számos enzimátikus folyamat létfontosságú elemei. Ezen koenzimek, enzimek és az általuk katalizált reakciók, amelyek különböző élőlényekben - a prokariótáktól az eukarótákig, az embert is beleértve - fontos szerepet játszanak, megismerése és tanulmányozása értékes információkat szolgáltat a számos folyamatról, a mikroorganizmusok energiatárolástól kezdve emberi hiánybetegségekig. A biokémiai és orvosi vonatkozásokon túl e konvencionális kémiai módszerekkel nehezen megvalósítható (C-H, C-OH és C-N aktiválás) folyamatok mechanizmusvizsgálata értékes adatokat és analógiákat nyújthat kémiai reakciók lefolyásáról is.

1.2.2.1. A B₁₂-koenzim és tőle függő enzimek szerepe és jelentősége

Számos kobalamin kofaktor függő enzim ismert, ilyenek például a ribonukleozid-trifoszfát reduktáz (EC 1.17.4.2)²⁴⁰⁻²⁴⁴, 5-metiltetrahidrofolát:homocisztein S-metiltranszferáz (EC 2.1.1.13)²⁴⁵⁻²⁴⁷, propándiol dehidratáz (EC 4.2.1.28)²⁴⁸⁻²⁵¹, glicerín dehidratáz (EC 4.2.1.30)²⁵²⁻²⁵⁵, etanolamin ammonia liáz (EC 4.3.1.7)²⁵⁶⁻²⁵⁸, lizin 5,6-aminomutáz (EC 5.4.3.3 és EC 5.4.3.4)^{259,260}, D-ornitin 4,5-aminomutáz (EC 5.4.3.5)²⁶¹, leucin 2,3-aminomutáz (EC 5.4.3.7)^{259,262}, metilaszpartát mutáz (EC 5.4.99.1, más néven glutamát mutáz)²⁶³⁻²⁶⁶, metilmalonil-CoA mutáz (EC 5.4.99.2)²⁶⁷⁻²⁷⁰, 2-metilénglutarát mutáz (EC 5.4.99.4)²⁷¹⁻²⁷³, izoubutiril-CoA mutáz (EC 5.4.99.9)²⁷⁴. Ezen enzimek számos biokémiai folyamatban, az emberi szervezetben is jelentős szerepet játszanak^{275,276}. Ezeken az enzimeken kívül az élőlényekben, így az emberi szervezetben is több olyan, nem enzim fehérje található, melyekhez a B₁₂-származékok specifikusan kötődnek (pl. korrin kötő intrinsic faktor²⁷⁷, haptokorrin^{278,279}, transzkobalamin II²⁸⁰⁻²⁸³). E fehérjék transzportfolyamatokban vesznek részt, illetve fontos receptorok.

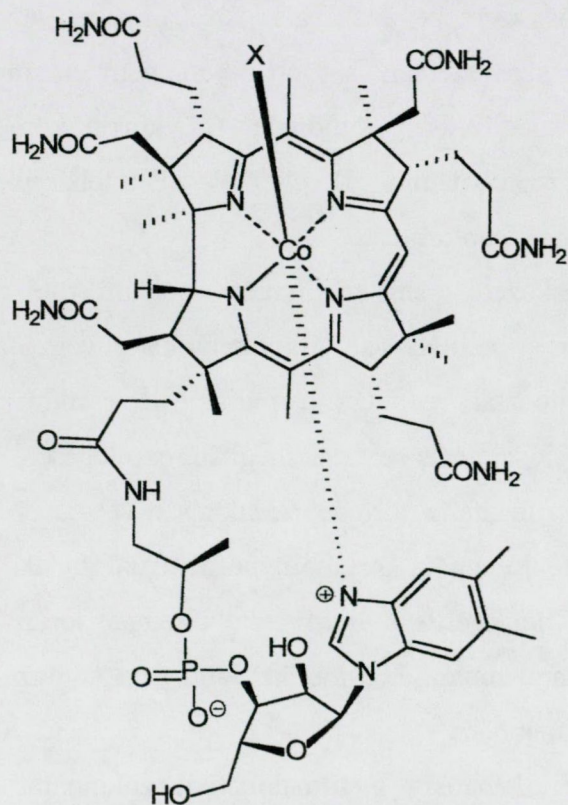
A metilkobalamin és más, vele rokon szerkezetű metil-korrinoidok például több mikroorganizmus energiaraktározásában fontos metilátadási folyamatokat végző enzimrendszerek koenzimeit. A ribonukleozid-trifoszfát reduktáz a purin és pirimidin metabolizmusban részt vevő enzim, amely a DNS bioszintézis sebességmeghatározó lépését, a ribonukleozid-trifoszfát 2'-dezoxiribonukleozid-trifoszfáttá történő átalakítását végzi. A különböző aminomutázok az aminosavak bioszintézisében és metabolizmusában játszanak jelentős szerepet. A diol dehidratáz és glicerín dehidratáz a lipid metabolizmus során fontosak. A metilaszpartát mutáz, a 2-metilénglutarát mutáz és a metilmalonil-CoA mutáz esszenciális dikarbonsavak metabolizmusában vesznek részt.

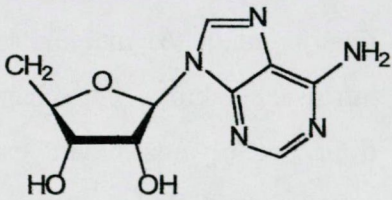
Ez utóbbi enzim az emberi szervezetben is megtalálható. A metilmalonáttól szukcináttal szolgáltató fontos metabolikus folyamatban két enzim vesz részt, melyek közül az egyik a működéséhez B₁₂-koenzimet igénylő metilmalonil-CoA mutáz. E metabolikus folyamat zavarai súlyos, akár halálhoz vezető hiánybetegséget okoznak. Tünetei részben megegyezők a B₁₂-vitamin hiány okozta tünetegyüttessel (gyermekeknél fejlődési rendellenességek, metilmalonaciduria, acilketonúria, hyperglycinémia), ám míg a B₁₂-vitamin hiány okozta tünetek kezelhetők a vitamin adagolásával, a genetikai okokra visszavezethető tünetegyüttés sok esetben nem. A legsúlyosabb, B₁₂-vitamin adagolással nem kezelhető

esetekben a vitaminból B_{12} -koenzimet szolgáltató enzimek vagy maga a metilmalonil-CoA mutáz nem termelődik.

1.2.2.2. A B_{12} -koenzim függő folyamatok tanulmányozásának módszerei

A B_{12} -származékok és a tőlük függő enzimek illetve az őket kötő egyéb fehérjék tanulmányozása összetett feladat, amely számos tudományterület (a szervetlen, analitikai és szerves kémiától a biokémián és mikrobiológián át a molekuláris genetikáig) ismereteinek és vizsgálati módszereinek felhasználását igényli ²⁸⁴⁻²⁸⁹.



	X
Ado-Cbl	 (B_{12} -koenzim)
Me-Cbl	CH ₃ (metil-kobalamin)
CN-Cbl	CN (B_{12} -vitamin)
HO-Cbl	OH (hidroxi-kobalamin)

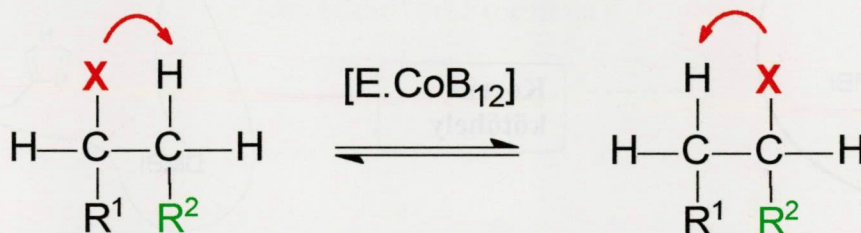
5. Ábra B_{12} -kofaktorok és vitaminok

Maguk a B_{12} -származékok kobaltorganikus vegyületek ²⁹⁰ (5. Ábra). E vegyületek illetve analogonjaik előállítása szervetlen, szerves kémiai illetve mikrobiológiai módszerekkel lehetséges.

A tiszta B₁₂-függő fehérjék a mikrobiológia, biokémia és molekuláris genetika számos módszerét felhasználva állíthatóak elő, módosíthatók ill. vizsgálhatóak (fehérjeizolálás, tisztítás; genetikai szekvencia és térszerkezet meghatározása; génsebészeti módszerekkel történő termeltetés, módosítás stb.)

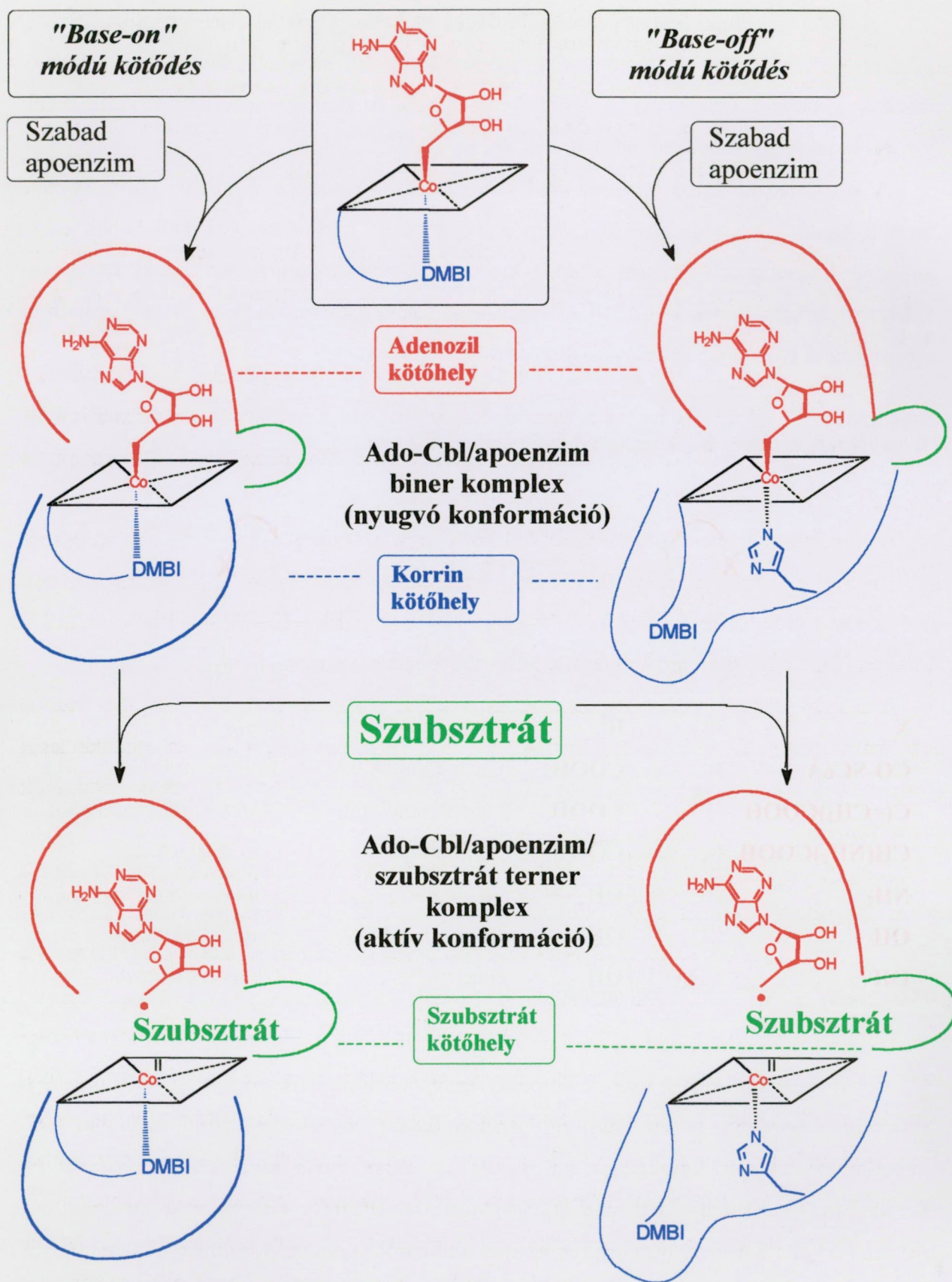
A B₁₂-koenzim függő enzimek által katalizált folyamatok (3. Táblázat) közös vonása, hogy a katalitikus ciklus első lépésében a B₁₂-koenzim (**Ado-Cbl**) központi kobalt és az adenzil ligandum C₅ atomjai közötti kovalens kötése homolitikusan hasad és az így keletkező gyökös termékek (Co^{II} ill. C₅-gyök) indítják el a szubsztráton a vándorló csoport és egy hidrogén 1,2-vándorlásával járó átrendeződési folyamatot.

3. Táblázat Néhány B₁₂-koenzim függő enzimatis reakció.



X	R ¹	R ²	Szubsztrát	Enzim
CO-SCoA	H	COOH	metilmalonil-CoA	Metilmalonil-CoA mutáz
C(=CH ₂)COOH	H	COOH	2-metilénglutarát	2-Metilénglutarát mutáz
CH(NH ₂)COOH	H	COOH	(S)-glutamát	Glutamát mutáz
NH ₂	H	OH	etanolamin	Etanolamin ammónia liáz
OH	CH ₃	OH	propán-1,2-diol	Diol dehidratáz
OH	CH ₂ OH	OH	glicerín	Glicerín dehidratáz

A B₁₂-koenzim kétféleképpen kötődhet az apoenzimhez (6. Ábra). Az enzimek egy részéhez a koenzim az ún. 'base-off' módon (ekkor az alsó nukleotid oldallánc 5,6-dimetilbenzimidazolil egységének nitrogénjét az enzim egyik hisztidinje helyettesíti és kötődéskor a nukleotid oldallánc a korrin gyűrű alól kihajlik), más része az ún. 'base-on' módon (ekkor a korrin gyűrű kobaltját az alsó α oldaltól az eredeti 5,6-dimetilbenzimidazolil nitrogén koordinálja) kötődhet. A homolízishez szükséges bázikus ligandum így tehát a 'base-off' enzimek esetében ez az enzim hisztidinjének nitrogénje, míg a 'base-on' enzimek esetében a koenzim nukleotid oldallánc 5,6-dimetilbenzimidazolil részének nitrogénje.



6. Ábra A B₁₂-koenzim kötődési módjai B₁₂-függő enzimreakciókban

A kötődési módot több enzim esetében meg lehetett határozni röntgenkristallográfia, ESR spektroszkópia, B₁₂-analogonokkal végzett enzimkinetikai vizsgálatok ill. genetikai szekvenciaanalógia alapján. E módszerek alapján a nagyobb apolárisabb vándorló csoportok átrendeződését katalizáló mutázok '*base-off*', míg a kisebb, poláris csoportok átrendeződését katalizáló eliminázok '*base-on*' természetű enzimeknek bizonyultak.

A B₁₂-származékok és a velük kölcsönható fehérjék hatásmechanizmusa könyveket megtöltő több évtizedes kutatás tárgya ²⁸⁵⁻²⁸⁹, ezért itt csak a vizsgálatra felhasznált korszerű módszereket sorolom fel.

Az B₁₂-származékok és a velük kölcsönható enzimek és együttese tanulmányozható kettős, statikus komplexekként (nem reagáló állapot) továbbá dinamikus, a szubsztrátokkal és enzimekkel együttesen alkotott hármas komplexekként. E komplexek vizsgálata során is számos módszer használható fel.

Fontos információk nyerhetők például kobalamin származékokkal ²⁹¹ vagy szubsztrát analógokkal ²⁶⁴ enzimkinetikai/inhibíciós vizsgálatok segítségével. A spektroszkópiai módszerek (statikus és dinamikus UV-VIS, FT-IR, Raman, CD, ESR, NMR, EXAFS, Röntgen-diffrakció, stb.) ugyancsak hatásos eszköznek bizonyultak.

A gyökös reakciók tanulmányozására a B₁₂-függő rendszerek esetében is nagyon hatásos eszköznek bizonyult az ESR spektroszkópia ²⁹²⁻²⁹⁹, segítségével gyökök és paramágneses centrumok jelenléte, egymással való kölcsönhatásaik és egymástól mérhető távolságuk mutatható ki.

A szerkezeti információk egyik igen fontos forrása az NMR spektroszkópia, kiragadott példaként említhetnénk a kobalaminszármazékok szilárd ill. oldatfázisú vizsgálatát ⁵⁹Co-NMR ³⁰⁰ vagy a glutamát mutáz B₁₂-kötő alegységének oldatfázisú szerkezetmeghatározását többdimenziós NMR ^{301,302} segítségével.

A röntgenkristallográfia mind a B₁₂-származékok (pl. a B₁₂-koenzim ³⁰³, vagy B₁₂-koenzim analogonok ³⁰⁴), mind ezek fehérjékkel alkotott komplexeinek szilárd fázisban történő szerkezetmeghatározására alkalmas, igen hatékony és informatív módszer. Proteinkristallográfia segítségével vált ismertté a metionin szintáz B₁₂-kötő alegységének szerkezete ^{305,306}, a metilmalonil-CoA mutáz ^{307,308}, valamint természetes szubsztáttal ³⁰⁹, illetve szubsztrát analogonokkal alkotott komplexeinek ³¹⁰ kristályszerkezete. Ez utóbbi szerkezetekből a fehérjének a szubsztrát kötődése közben lezajló konformációváltozására lehetett következtetni. A legutóbbi időben vált ismertté a glutamát mutáz ³¹¹ és a propándiol dehidratáz ³¹² szerkezete is.

Említésre méltó eredmények érhetők el a mai számítási teljesítmények és módszerek segítségével is. Homológia modell (a genetikai szekvencia analógiáinak, homológiájának felhasználása: sok esetben a magas homológiát felmutató szekvenciák térszerkezete igen hasonló) elkészítésével az emberi metilmalonil-CoA mutáz esetében tanulmányozható volt a metilmalonuriát okozó pontmutációk hatása ³¹³.

IRODALOM AZ 1. FEJEZETHEZ

1. Aboul-Enein, H. Y.; Wainer, I. W. *The Impact of stereochemistry on drug development and use*; John Wiley: New York, 1997.
2. Ager, D. J. *Handbook of chiral chemicals*; Marcel Dekker: New York, 1999.
3. Sheldon, R. A. *Chirotehnology*, Marcel Dekker: New York; Basel, 1993.
4. Collins, A. N.; Sheldrake, G. N.; Crosby, J. *Chirality in industry*; Wiley: Chichester; New York, 1992
5. Coutts, R. T.; Baker, G. B. *Chirality* 1989, 1, 99.
6. Burger, A. In *The Basis of Medicinal Chemistry*, Part I; Wolff, M. E., Ed.; Wiley: New York, 1980; p. 1.
7. Bull, A. T.; Bunch, A. W.; Robinson, G. K., *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999, 2, 246.
8. Marrs, B.; Delagrave, S.; Murphy, D., *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999, 2, 241.
9. Jacques, J.; Collet, A.; Wilen, S. H. *Enantiomers, racemates, and resolutions*; Wiley: New York, 1981.
10. Fogassy, E.; Ács, M.; Tőke, L. *Optikai izomerek előállítása (A Kémia újabb eredményei)*, Akadémiai Kiadó: Budapest, 1990.
11. Izumi, Y.; Tai, A. *Stereo-differentiating reactions: the nature of asymmetric reactions*; Academic Press: New York, 1977.
12. Morrison, J. D.; Scott, J. W. *Asymmetric synthesis*; Academic Press: New York, 1983.
13. Rahman, A.-u.; Shah, Z. *Stereoselective synthesis in organic chemistry*; Springer: Berlin; New York, 1993.
14. Wiechert, R.; Ottow, E.; Schöllkopf, K.; Schulz, B. G. *Stereoselective synthesis*; Springer-Verlag: Berlin; New York, 1993.

15. Trost, B. M. *Stereocontrolled organic synthesis*; Blackwell Scientific Publications: Oxford; Boston, 1994.
16. Nógrádi, M. *Stereoselective synthesis: a practical approach*, VCH: Weinheim; New York, 1995.
17. Atkinson, R. S. *Stereoselective synthesis*; Wiley: Chichester; New York, 1995.
18. Curran, D. P.; Porter, N. A.; Giese, B. *Stereochemistry of radical reactions: concepts, guidelines, and synthetic applications*; VCH: Weinheim; New York, 1996.
19. Procter, G. *Stereoselectivity in organic synthesis*; Oxford University Press: Oxford; New York, 1998.
20. Ward, R. S. *Selectivity in organic synthesis*; Wiley: Chichester; New York, 1999.
21. Ho, T.-L. *Stereoselectivity in synthesis*; Wiley: New York, 1999.
22. Abramowicz, D. A. *Biocatalysis*; Van Nostrand Reinhold: New York, 1990.
23. Blanch, H. W.; Clark, D. S. *Applied biocatalysis*; M. Dekker: New York, 1991.
24. Poppe, L.; Novák, L. *Selective biocatalysis: a synthetic approach*; VCH: Weinheim ; New York, 1992.
25. Cabral, J. M. S. *Applied biocatalysis*; Harwood Academic Publishers: Chur; New York, 1994.
26. Roberts, S. M. *Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms*; Cambridge University Press: Cambridge; New York, 1995.
27. Flickinger, M. C.; Drew, S. W. *The encyclopedia of bioprocess technology : fermentation, biocatalysis, and bioseparation*; John Wiley: New York, 1999.
28. Fessner, W. D. (Ed.), *Biocatalysis: from discovery to application*; Springer: Berlin, 1999.
29. Roberts, S. M. (Ed.) *Biocatalysts for fine chemical synthesis*; Wiley-VCH: Weinheim ; New York, 1999.
30. Neidleman, S. L., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1992**, *3*, 119.
31. Kazlauskas, R. J., *Trends. Biotechnol.*, **1993**, *11*, 439.
32. Faber, K.; Franssen, M. C., *Trends. Biotechnol.*, **1993**, *11*, 461.
33. Abdul Mazid, M., *Biotechnology (N Y)*, **1993**, *11*, 690.

34. Turner, M. K., *Trends. Biotechnol.*, **1995**, *13*, 173.
35. Wackett, L. P., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **1997**, *19*, 350.
36. May, S. W., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1997**, *8*, 181.
37. Dordick, J. S.; Khmelnitsky, Y. L.; Sergeeva, M. V., *Curr. Opin. Microbiol.*, **1998**, *1*, 311.
38. Kelly, R. M.; Waldmann, H., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, *3*, 9.
39. Hodgson, J., *Biotechnology (N Y)*, **1994**, *12*, 789.
40. Adams, M. W. W.; Kelly, R. M., *Biocatalysis at extreme temperatures: enzyme systems near and above 100 °C*; American Chemical Society: Washington, DC, 1992.
41. Adams, M. W.; Perler, F. B.; Kelly, R. M., *Biotechnology (N Y)*, **1995**, *13*, 662.
42. Hough, D. W.; Danson, M. J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, *3*, 39.
43. Michels, P. C.; Khmelnitsky, Y. L.; Dordick, J. S.; Clark, D. S., *Trends. Biotechnol.*, **1998**, *16*, 210.
44. Altreuter, D. H.; Clark, D. S., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1999**, *10*, 130.
45. Arnold, F. H.; Moore, J. C., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **1997**, *58*, 1.
46. Haeffner, F.; Norin, T.; Hult, K., *Biophys. J.*, **1998**, *74*, 1251.
47. Rétey, J., *Angew. Chem.*, **1990**, *102*, 373; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **29**, 355.
48. International Union of Biochemistry, *Enzyme Nomenclature 1984*, Academic Press: New York, 1984.
49. Dixon, M.; Webb, E. C. (Eds.), *Enzymes*, 3rd Ed., Academic Press: Orlando, 1979.
50. Barman, T. E. (Ed.), *Enzyme Handbook*, Springer Verlag: Berlin, 1985.
51. Nikolova, P.; Ward, O. P., *J. Ind. Microbiol.*, **1993**, *12*, 76.
52. Tramper, J., *Biocatalysis in non-conventional media*, Elsevier: Amsterdam; New York, 1992.
53. Cabral, J. M.; Aires-Barros, M. R.; Pinheiro, H.; Prazeres, D. M., *J. Biotechnol.*, **1997**, *59*, 133.
54. Khmelnitsky, Y. L.; Rich, J. O., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, *3*, 47.
55. Lamare, S.; Legoy, M. D., *Trends. Biotechnol.*, **1993**, *11*, 413.

56. Pasta, P.; Mazzola, G.; Carrea, G.; Riva, S., *Biotechnol. Lett.*, **1989**, *11*, 643.
57. Luisi, P. L., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1985**, *24*, 439.
58. Martinek, K.; Lerashov, A. V.; Klyachko, N.; Khmelnitsky, Y. L.; Berezin, I. V.; *Eur. J. Biochem.*, **1986**, *155*, 453.
59. Shield, J. W.; Ferguson, H. D.; Bommarius, A. S.; Hatton, T. A., *Ind. Eng. Chem., Fundam.*, **1986**, *25*, 603.
60. Sheper, T.; Likidis, Z.; Makkyaleas, K.; Nowotny, C.; Schüberl, K., *Enzyme Microb. Technol.*, **1987**, *9*, 25.
61. Sanchez-Ferrer, A.; Garcia-Carmona, F., *Enzyme. Microb. Technol.*, **1994**, *16*, 409.
62. Miethe, P.; Gruber, R.; Voss, H., *Biotechnol. Lett.*, **1989**, *11*, 449.
63. Ramos-Tombo, G. M.; Schär, H. P.; Fernandez, X.; Busquets, I.; Ghisalba, O.; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 5707.
64. Zaborsky, O. R. *Immobilized Enzymes*, CRC Press: Cleveland, 1973.
65. Messing, R. A. *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*, Academic Press: New York, 1975.
66. Barker, S. A.; Kennedy, J. F., in *Handbook of Enzyme Biotechnology, Part II*, Wisemann, A. (Ed.), Ellis Horwood: New York, p 203., 1975.
67. Mosbach, K., *Meth. Enzymol.*, **1976**, *44*.
68. Chibata, I., *Immobilized Enzymes, Research and Development*, Halsted: New York, 1978.
69. Wingard, L. B.; Katchalski-Katzir, E.; Goldstein, L., *Applied Biochemistry and Bioengineering, Vol. 1: Immobilized Enzyme Principles*, Academic Press: New York, 1976.
70. Trevan, M. D. *Immobilized Enzymes: Introduction and Application in Biotechnology*, Wiley: New York, 1980.
71. Sharma, B. P.; Bailey, L. F.; Messing, E. A., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1982**, *21*, 837.
72. Klibanov, A. M., *Science*, **1983**, *219*, 722.
73. Woodward, J. *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach*, IRL Press: Oxford, 1985.

74. Gekas, V. C., *Enzyme Microb. Technol.*, **1986**, *8*, 450.
75. Bednarski, M. D.; Chenault, H. K.; Simon, E. S.; Whitesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, **1987**, 1283.
76. Kennedy, J. F.; Cabral, J. M. S., "Enzyme Immobilization" in *Biotechnology, Vol. 7A*, Rehm, H. J.; Reed, G. (Eds.), VCH: Weinheim, pp 347-404; 1987.
77. Hartmeier, W. *Immobilized Biocatalysts*, Springer: Berlin, 1988.
78. Chang, T. M., *Ann. NY Acad. Sci.*, **1990**, *613*, 109.
79. Parthasarathy, R. V.; Martin, C. R., *Nature*, **1994**, *369*, 298.
80. Clark, D. S., *Trends. Biotechnol.*, **1994**, *12*, 439.
81. Moody, P. C. E.; Wilkinson, T. *Protein engineering*; IRL Press at Oxford University Press: Oxford ; New York, 1990.
82. Crabbe, M. J. C. *Enzyme biotechnology: protein engineering, structure prediction, and fermentation*; E. Horwood: New York, 1990.
83. Wrede, P.; Schneider, G. *Concepts in protein engineering and design: an introduction*; W. de Gruyter: Berlin ; New York, 1994.
84. Cleland, J. L.; Craik, C. S. *Protein engineering: principles and practice*; Wiley-Liss: New York, 1996.
85. Carey, P. R. *Protein engineering and design*; Academic Press: San Diego, 1996.
86. Angeletti, R. H. *Proteins: analysis and design*; Academic Press: San Diego, 1998.
87. Sadana, A. *Biocatalysis: fundamentals of enzyme deactivation kinetics*; Prentice Hall: Englewood Cliffs, N.J., 1991.
88. Magdassi, S. *Surface activity of proteins: chemical and physicochemical modifications*; Marcel Dekker: New York, 1996.
89. Nosoh, Y.; Sekiguchi, T. *Protein stability and stabilization through protein engineering*; E. Horwood: New York, 1991.
90. Himmel, M. E.; Georgiou, G. *Biocatalyst design for stability and specificity*; American Chemical Society: Washington, DC, 1993.
91. Himmel, M. E.; Georgiou, G. *Biocatalyst design for stability and specificity*; American Chemical Society: Washington, DC, 1993.

92. El-Gewely, M. R. *Site-directed mutagenesis and protein engineering (proceedings of the International Symposium on Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering)*; Elsevier: Amsterdam; New York, 1991.
93. Klibanov, A. M., *Chemtech*, **1986**, *16*, 354.
94. Zaks, A.; Klibanov, A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, 3192.
95. Geutzen, I.; Löffler, H. G.; Schneider, F., *Z. Naturforsch., C.*, **1980**, *35*, 544.
96. Chenault, H. K.; Dahmer, J.; Whitesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 6354.
97. Nakamura, K.; Kawai, Y.; Oka, S.; Ohno, A., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 2245.
98. Kunugi, S.; Tanabe, K.; Yamashita, K.; Morikawa, Y.; Ito, T.; Kondoh, T.; Hirata, K.; Nomura, A., *Bull. Chem. Soc., Japan*, **1989**, *62*, 514.
99. Rehm, H. J.; Reed, G. (Eds.) *Biotechnology, Vol. 1: Microbial Fundamentals*, VCH: Weinheim, 1981.
100. Collins, C. H.; Lyne, P. M.; Grange, G. M. (Eds.), *Microbiological Methods*, 6th Ed., Butterworth: London, 1989.
101. Sih, C. J.; Chen, C. S., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 570.
102. Chen, C. S.; Zhou, B. M.; Girdaukas, G.; Shieh, W. R.; Van Middlesworth, F.; Gopalan, A. S.; Sih, C. J., *Bioorg. Chem.* **1984**, *12*, 98.
103. Shieh, W. R.; Gopalan, A. S.; Sih, C. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2993.
104. Empie, M. W.; Gross, A., *Annu. Rep. Med. Chem.* **1988**, *23*, 305.
105. Chang, T. M. S. *Artificial Cells*, Thomas: Springfield, 1972.
106. Chang, T. M. S. *Microencapsulation and Artificial Cells*, Humana Press: Clifton, 1984.
107. Whitesides, G. M.; Wong, C. H., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 617.
108. Yamada, H.; Shimizu, S., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 622.
109. Malki, V. S.; Lillehoj, E. P. *Antibody Techniques*, Academic Press: San Diego, 1994.
110. Borrebaeck, C. A. K. *Antibody engineering*, 2nd ed.; Oxford University Press: New York, 1995.
111. King, D. J. *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies*, Taylor & Francis: Oxford, 1998.

112. Ciba Foundation symposium [159], *Catalytic antibodies*; John Wiley & Sons: Chichester; New York, 1991.
113. Coxon, J. M. *Mechanisms of biological importance*; JAI Press: Greenwich, Conn., 1992.
114. Suckling, C. J., *Biochem. Soc. Trans.*, **1992**, *20*, 216.
115. Baron, D., *Naturwissenschaften*, **1992**, *79*, 15.
116. Benkovic, S. J., *Annu. Rev. Biochem.*, **1992**, *61*, 29.
117. Janda, K. D., *Biochem. Soc. Trans.*, **1993**, *21*, 1090.
118. Amital, H.; Tur-Kaspa, I.; Tashma, Z.; Hendler, I.; Shoenfeld, Y., *Methods. Mol. Biol.*, **1995**, *51*, 203.
119. Driggers, E. M.; Schultz, P. G., *Adv. Protein. Chem.*, **1996**, *49*, 261.
120. Keinan, E.; Sinha, S. C.; Shabat, D.; Itzhaky, H.; Reymond, J. L., *Acta. Chem. Scand.*, **1996**, *50*, 679.
121. Kirby, A. J., *Acta. Chem. Scand.*, **1996**, *50*, 203.
122. Paul, S., *Mol. Biotechnol.*, **1996**, *5*, 197.
123. Thomas, N. R., *Nat. Prod. Rep.*, **1996**, *13*, 479.
124. Wentworth, P.; Janda, K. D., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1998**, *2*, 138.
125. Goding, J. W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press: New York, 1986.
126. Posner, B.; Smiley, J.; Lee, I.; Benkovic, S., *Trends. Biochem. Sci.*, **1994**, *19*, 145.
127. Shokat, K. M.; Leumann, C. J.; Sugawara, R.; Schultz, P. G., *Nature (London)* **1989**, *338*, 269.
128. Janjic, N.; Tramontano, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 9109.
129. Hilvert, D.; Hill, K. W.; Nared, K. D.; Auditor, M. T. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 9261.
130. Pollack, S. J.; Hsiun, P.; Schultz, P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 5961.
131. Persidis, A., *Nat. Biotechnol.*, **1997**, *15*, 1313.
132. Long, D. M.; Uhlenbeck, O. C., *Faseb. J.*, **1993**, *7*, 25.

133. Seelig, B.; Jaschke, A., *Chem. Biol.*, **1999**, *6*, 167.
134. Cech, T. R., *Biochem. Soc. Trans.*, **1993**, *21*, 229.
135. Kevin J. Scanlon, K. J.; Kashani-Sabet M., *Ribozymes in the Gene Therapy of Cancer Medical Intelligence Unit*, R G Landes Co: NewYork, 1998.
136. Li, Y.; Breaker, R. R., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, *9*, 315.
137. Eckstein F.; Lilley, D. M. J. *Catalytic RNA (Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol. 10)*, Springer Verlag: Berlin, 1996.
138. Arnold, F. H.; Moore, J. C. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1997**, *58*, 1.
139. Marrs, B.; Delagrave, S.; Murphy, D. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 241.
140. Rehm, H.; Reed, G. (Eds.), *Biotechnology, Vol. 4: Microbial Products II*, VCH: Weinheim, 1986.
141. Rehm, H. J.; Reed, G. (Eds.), *Biotechnology, Vol. 6A: Biotransformations*, (Kieslich, K., Vol. Ed.), VCH: Weinheim, 1984.
142. Moo-Young, M. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology, Vol. 3: The Practice of Biotechnology: Current Commodity Chemicals*, Pergamon Press: Oxford, 1985.
143. Moo-Young, M. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology, Vol. 4: The Practice of Biotechnology: Speciality Products and Service Activities*, Pergamon Press: Oxford, 1985.
144. Mahato, S. B.; Majumdar, I., *Phytochemistry*, **1993**, *34*, 883.
145. Mahato, S. B.; Garai, S., *Steroids*, **1997**, *62*, 332.
146. Iizuka, H.; Naito, A., *Microbial Transformations of Steroids and Alkaloids*, Springer: Berlin; New York, 1981.
147. Holland, H. L., in "The Alkaloids", Vol. 19, Ch. 5, Rodrigo, R. G. A. (Ed.), Academic Press: New York, pp 324-400; 1981.
148. Aida, K.; Chibata, I.; Nakayama, K.; Takinami, K.; Yamada, H. (Eds.), *Biotechnology of Amino Acid Production*, Elsevier: Amsterdam, 1986.
149. Ogata, K.; Kinoshita, S.; Tsunoda, T.; Aida, K. (Eds.), *Microbial Production of Nucleic Acid-Related Substances*, Kodanska: Tokyo, 1976.
150. Kuninaka, A., in *Biotechnology, Vol. 4*, Rehm, H. J., Reed, G. (Eds.), VCH: Weinheim, p 71; 1986.

151. Spencer, J. F. T.; Gorin, P. A. J., *"Microbiological Transformations of Sugars and Related Compounds"* in *Progr. Ind. Microbiol.*, Vol. 7, Heywood and Co.: London, p 177; 1965.
152. Swanson, P. E., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1999**, *10*, 365.
153. Jaeger, K. E.; Reetz, M. T., *Trends. Biotechnol.*, **1998**, *16*, 396.
154. Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Krieger, N.; Soccol, V. T., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **1999**, *29*, 119.
155. Orru, R. V.; Archelas, A.; Furstoss, R.; Faber, K., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **1999**, *63*, 145.
156. Linko, Y. Y.; Lamsa, M.; Wu, X.; Uosukainen, E.; Seppala, J.; Linko, P., *J. Biotechnol.*, **1998**, *66*, 41.
157. James, J.; Simpson, B. K., *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, **1996**, *36*, 437.
158. Krastanov, A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1997**, *47*, 476.
159. Tillman, J. A.; Seybold, S. J.; Jurenka, R. A.; Blomquist, G. J., *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **1999**, *29*, 481.
160. Högberg, H.-E.; Berghund, P.; Edlund, H.; Fägerhag, J.; Hedenström, E.; Lundh, M.; Nordin, O.; Servi, S.; Vörde, C., *Catalysis Today*, **1995**, *22*, 591.
161. Belan, A.; Bolte, J.; Fauve, A.; Gourcy, J. G.; Veschambre, H., *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 256.
162. Wang, Y. F.; Lalonde, J. J.; Momongau, M.; Bergbreiter, D. E.; Wong, C. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 7200.
163. Keinan, E.; Sinha, S. C.; Shabat, D.; Itzhaky, H.; Reymond, J. L., *Acta. Chem. Scand.*, **1996**, *50*, 679.
164. Hoff, J. H. v. t., *Arch. Nederl. Sci.Exactes Nat.*, **1874**, *9*, 445.
165. Hoff, J. H. v. t.; Werner, A.; Eiloart, A. *The arrangement of atoms in space*, Longmans-Green: London, New York, Bombay, 1898.
166. Le Bel, J. A., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1874**, *22(2)*, 337.
167. Eliel, E. L. *Stereochemistry of carbon compounds*; McGraw-Hill: New York,, 1962.
168. Mislow, K. *Introduction to stereochemistry*; W. A. Benjamin: New York,, 1965.
169. Kagan, H. *Organic stereochemistry*; Wiley: New York, 1979.

-
170. Nógrádi, M. *Stereochemistry, basic concepts and applications*, Pergamon Press: Oxford; New York, 1981.
 171. Tamm, C. *Stereochemistry*; Elsevier: Amsterdam; New York, 1982.
 172. Juaristi, E. *Introduction to stereochemistry and conformational analysis*; Wiley: New York, 1991.
 173. Nasipuri, D. *Stereochemistry of organic compounds: principles and applications*; Wiley: New York, 1991.
 174. Eliel, E. L.; Wilen, S. H.; Mander, L. N. *Stereochemistry of organic compounds*; Wiley: New York, 1994.
 175. Dodziuk, H. *Modern conformational analysis: elucidating novel exciting molecular structures*; VCH: New York, 1995.
 176. Buxton, S. R.; Roberts, S. M. *Guide to organic stereochemistry*; Longman: Harlow, 1996.
 177. North, M. *Principles and applications of stereochemistry*; Stanley Thornes Publishers: Cheltenham, 1998.
 178. Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294.
 179. Chen, C. S.; Wu, S. H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812.
 180. Chen, C. S.; Sih, C. J., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 695.
 181. Wang, Y. F.; Chen, C. S.; Girdaukas, G.; Sih, C. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3695.
 182. Kyte, J. *Structure in protein chemistry*; Garland Pub.: New York, 1995.
 183. Creighton, T. E. *Protein structure: a practical approach*, IRL Press at Oxford University Press: Oxford; New York, 1997.
 184. Brändén, C.-I.; Tooze, J. *Introduction to protein structure*, Garland Pub.: New York, 1999.
 185. Pain, R. H. *Mechanisms of protein folding*; IRL Press at Oxford University Press: Oxford; New York, 1994.
 186. Burgen, A.; Barnard, E. A. *Receptor subunits and complexes*; Cambridge University Press: Cambridge; New York, 1992.
 187. Winzor, D. J.; Sawyer, W. H. *Quantitative characterization of ligand binding*; Wiley: New York, 1995.

188. Klotz, I. M. *Ligand-Receptor Energetics*, Wiley: New York , 1997.
189. Perutz, M. F. *Protein structure: new approaches to disease and therapy*; W.H. Freeman and Co.: New York, 1992.
190. McRee, D. E. *Practical protein crystallography*; Academic Press: San Diego, 1993.
191. Drenth, J. *Principles of protein X-ray crystallography*; Springer-Verlag: New York, 1994.
192. Havel, H. A. *Spectroscopic methods for determining protein structure in solution*; VCH: New York, 1996.
193. Fasman, G. D. *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*; Plenum Press: New York, 1996.
194. Roberts, G. C. K. *NMR of macromolecules: a practical approach*; IRL Press at Oxford University Press: Oxford ; New York, 1993.
195. Tycko, R. *Nuclear magnetic resonance probes of molecular dynamics*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht ; Boston, 1994.
196. Kubinyi, H.; Folkers, G.; Martin, Y. C. *3D QSAR in drug design*; Kluwer/ESCOM: Dordrecht, 1998.
197. Soumpasis, D. M.; Jovin, T. M. *Computation of biomolecular structures: achievements, problems, and perspectives*; Springer-Verlag: Berlin; New York, 1993.
198. Merz, K. M.; Le Grand, S. M. *The Protein folding problem and tertiary structure prediction*; Birkhäuser: Boston, 1994.
199. Sternberg, M. J. E. *Protein structure prediction: a practical approach*; IRL Press at Oxford University Press: Oxford ; New York, 1996.
200. Fraga, S.; Parker, J. M. R.; Pocock, J. M. *Computer simulations of protein structures and interactions*; Springer-Verlag: Berlin; New York, 1995.
201. Bicout, D.; Field, M. *Quantum mechanical simulation methods for studying biological systems (Les Houches Workshop)*; Springer-Verlag: Berlin; New York, 1996.
202. Taylor, W. R. *Patterns in protein sequence and structure*; Springer-Verlag: Berlin ; New York, 1992.
203. Zaidi, Z. H.; Smith, D. L. *Protein structure-function relationship*; Plenum Press: New York, 1996

-
204. Fukui, T.; Soda, K. *Molecular aspects of enzyme catalysis*; VCH: Weinheim; New York, 1994.
 205. Creighton, T. E. *Protein function: a practical approach*, 2nd ed.; IRL Press at Oxford University Press: Oxford ; New York, 1997.
 206. Hayaishi, O. *Enzyme mechanism*; University Park Press: Baltimore, 1973.
 207. Hollaway, M. R. *The mechanism of enzyme action*; Oxford University Press: London, 1976.
 208. Kuby, S. A. *Mechanism of enzyme action*; CRC Press: Boca Raton, 1991.
 209. Mildner, P.; Ries, B. (Eds.) *Enzyme regulation and mechanism of action*, 1st ed.; Pergamon Press: Oxford; New York, 1980.
 210. Fersht, A. *Enzyme structure and mechanism*, 2nd ed.; W.H. Freeman: New York, 1985.
 211. Fersht, A. *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*; W.H. Freeman: New York, 1999.
 212. Cooper, A.; Houben, J. L.; Chien, L. C. *The enzyme catalysis process: energetics, mechanism, and dynamics*; Plenum Press: New York, 1989.
 213. Segel, I. H. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*; Wiley: New York, 1993.
 214. Matthews, J. C. *Fundamentals of Receptor, Enzyme, and Transport Kinetics*, CRC Press: Boca Raton, 1993.
 215. Gutfreund, H. *Kinetics for the Life Sciences : Receptors, Transmitters and Catalysts*, Cambridge Univ Press: Cambridge, 1995.
 216. Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of enzyme kinetics*, Portland Press: London, 1995.
 217. Purich, D. L. *Enzyme kinetics and mechanism*; Academic Press: San Diego, 1995.
 218. Purich, D. L. *Contemporary enzyme kinetics and mechanism*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, 1996.
 219. Purich, D. L. *Enzyme kinetics and mechanism isotopic probes and complex enzyme systems*; Academic Press: New York, 1980.
 220. Rétey, J.; Robinson, J. A. *Stereospecificity in organic chemistry and enzymology*; VCH: Weinheim, 1982.
 221. Cook, P. F. *Enzyme mechanism from isotope effects*; CRC Press: Boca Raton, 1991.

- 222. Hanson, K. R.; Havir, E. A., *Recent Adv. Phytochem.* **1978**, *12*, 91.
- 223. Hahlbrock, K.; Scheel, D., *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **1989**, *40*, 347.
- 224. Appert, C.; Logemann, E.; Hahlbrock, K.; Schmid, J.; Amrhein, N., *Eur. J. Biochem.*, **1994**, *225*, 491.
- 225. Felton, G. W.; Korth, K. L.; Bi, J. L.; Wesley, S. V.; Huhman, D. V.; Mathews, M. C.; Murphy, J. B.; Lamb, C.; Dixon, R. A., *Curr. Biol.*, **1999**, *9*, 317.
- 226. Orum, H.; Rasmussen, O. F., *Appl Microbiol Biotechnol*, **1992**, *36*, 745.
- 227. Faulkner, J. D.; Anson, J. G.; Tuite, M. F.; Minton, N. P., *Gene*, **1994**, *143*, 13.
- 228. Schuster, B.; Rétey, J., *FEBS Lett.*, **1994**, *349*, 252.
- 229. Schuster, B.; Rétey, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 8433.
- 230. Levy, H. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 1811.
- 231. Sarkissian, C. N.; Shao, Z.; Blain, F.; Peevers, R.; Su, H.; Heft, R.; Chang, T. M.; Sriver, C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 2339.
- 232. Wu, P. C.; Kroening, T. A.; White, P. J.; Kendrick, K. E., *J. Bacteriol.*, **1992**, *174*, 1647.
- 233. Hernandez, D.; Stroh, J. G.; Phillips, A. T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1993**, *307*, 126.
- 234. Taylor, R. G.; McInnes, R. R., *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 27473.
- 235. Schwede, T. F.; Rétey, J.; Schulz, G. E., *Biochemistry*, **1999**, *38*, 5355.
- 236. Langer, M.; Pauling, A.; Rétey, J., *Angew. Chem.*, **1995**, *107*, 1585; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 1464.
- 237. Langer, M.; Reck, G.; Reed, J.; Rétey, J., *Biochemistry*, **1994**, *33*, 6462.
- 238. Langer, B.; Starck, J.; Langer, M.; Rétey, J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 1077.
- 239. Rétey, J., *Naturwissenschaften*, **1996**, *83*, 439.
- 240. Stutzenberger, F., *J. Gen. Microbiol.*, **1974**, *81*, 501.
- 241. Sando, G. N.; Blakley, R. L.; Hogenkamp, H. P.; Hoffmann, P. J., *J. Biol. Chem.*, **1975**, *250*, 8774.
- 242. Stubbe, J.; Ackles, D.; Segal, R.; Blakley, R. L., *J. Biol. Chem.*, **1981**, *256*, 4843.
- 243. Booker, S.; Licht, S.; Broderick, J.; Stubbe, J., *Biochemistry*, **1994**, *33*, 12676.

244. Tauer, A.; Benner, S. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 53.
245. Banerjee, R. V.; Matthews, R. G., *Faseb. J.*, **1990**, *4*, 1450.
246. Drummond, J. T.; Matthews, R. G., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1993**, *338*, 687.
247. Banerjee, R.; Chen, Z.; Gulati, S., *Methods. Enzymol.*, **1997**, *281*, 189.
248. Toraya, T.; Shirakashi, T.; Kosuga, T.; Fukui, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1976**, *69*, 475.
249. Toraya, T.; Fukui, S., *Eur. J. Biochem.*, **1977**, *76*, 285.
250. Poznanskaja, A. A.; Tanizawa, K.; Soda, K.; Toraya, T.; Fukui, S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1979**, *194*, 379.
251. Tobimatsu, T.; Sakai, T.; Hashida, Y.; Mizoguchi, N.; Miyoshi, S.; Toraya, T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1997**, *347*, 132.
252. Daniel, R.; Gottschalk, G., *FEMS Microbiol. Lett.*, **1992**, *79*, 281.
253. Seyfried, M.; Daniel, R.; Gottschalk, G., *J. Bacteriol.*, **1996**, *178*, 5793.
254. Tobimatsu, T.; Azuma, M.; Matsubara, H.; Takatori, H.; Niida, T.; Nishimoto, K.; Satoh, H.; Hayashi, R.; Toraya, T., *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 22352.
255. Luers, F.; Seyfried, M.; Daniel, R.; Gottschalk, G., *FEMS Microbiol. Lett.*, **1997**, *154*, 337.
256. Blackwell, C. M.; Turner, J. M., *Biochem. J.*, **1978**, *175*, 555.
257. O'Brien, R. J.; Fox, J. A.; Kopczynski, M. G.; Babior, B. M., *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 16131.
258. Faust, L. P.; Babior, B. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1992**, *294*, 50.
259. Poston, J. M., *J. Biol. Chem.*, **1976**, *251*, 1859.
260. Ward, N. E.; Jones, J.; Maurice, D. V., *J. Nutr.*, **1988**, *118*, 159.
261. Somack, R.; Costilow, R. N., *Biochemistry*, **1973**, *12*, 2597.
262. Ward, N. E.; Jones, J.; Maurice, D. V., *J. Nutr.*, **1988**, *118*, 159.
263. Barker, H. A., *Methods. Enzymol.*, **1985**, *113*, 121.
264. Leutbecher, U.; Bocher, R.; Linder, D.; Buckel, W., *Eur. J. Biochem.*, **1992**, *205*, 759.
265. Holloway, D. E.; Marsh, E. N., *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 20425.

266. Chen, H. P.; Marsh, E. N., *Biochemistry*, **1997**, *36*, 14939.
267. Fenton, W. A.; Hack, A. M.; Willard, H. F.; Gertler, A.; Rosenberg, L. E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1982**, *214*, 815.
268. Murthy, V. V.; Jones, E.; Cole, T. W.; Johnson, J., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1977**, *483*, 487.
269. Watanabe, F.; Abe, K.; Tamura, Y.; Nakano, Y., *Microbiology*, **1996**, *142*, 2631.
270. Wilkemeyer, M. F.; Crane, A. M.; Ledley, F. D., *Biochem. J.*, **1990**, *271*, 449.
271. Michel, C.; Hartrampf, G.; Buckel, W., *Eur. J. Biochem.*, **1989**, *184*, 103.
272. Michel, C.; Albracht, S. P.; Buckel, W., *Eur. J. Biochem.*, **1992**, *205*, 767.
273. Zelder, O.; Beatrix, B.; Leutbecher, U.; Buckel, W., *Eur. J. Biochem.*, **1994**, *226*, 577.
274. Zerbe-Burkhardt, K.; Ratnatilleke, A.; Philippon, N.; Birch, A.; Leiser, A.; Vrijbloed, J. W.; Hess, D.; Hunziker, P.; Robinson, J. A., *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 6508.
275. Bender, D. A. *Nutritional biochemistry of the vitamins*; Cambridge University Press: Cambridge ; New York, 1992.
276. Brody, T. *Nutritional biochemistry*; Academic Press: San Diego, 1994.
277. Monin, B.; Gueant, J. L.; Gerard, A.; Michalski, J. C.; Vidailhet, M.; Grignon, G.; Nicolas, J. P., *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **1990**, *10*, 87.
278. Hewitt, J. E.; Seetharam, B.; Leykam, J.; Alpers, D. H., *Eur. J. Biochem.*, **1990**, *189*, 125.
279. Brown, K. L.; Brooks, H. B.; Behnke, D.; Jacobsen, D. W., *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 6737.
280. Hall, C. A.; Colligan, P. D., *Exp. Cell. Res.*, **1989**, *183*, 159.
281. Li, N.; Seetharam, S.; Lindemans, J.; Alpers, D. H.; Arwert, F.; Seetharam, B., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1993**, *1172*, 21.
282. Fedosov, S. N.; Petersen, T. E.; Nexø, E., *Biochemistry*, **1995**, *34*, 16082.
283. Li, N.; Seetharam, S.; Seetharam, B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, *208*, 756.
284. Babior, B. M. *Cobalamin: biochemistry and pathophysiology*; Wiley: New York, 1975.
285. Zagalak, B.; Friedrich, W. *Vitamin B₁₂ (proceedings of the 3rd European Symposium on Vitamin B₁₂ and Intrinsic Factor)*; W. de Gruyter: Berlin ; New York, 1979.

-
286. Dolphin, D. *B₁₂*; Wiley: New York, 1982.
287. Schneider, Z.; Stroinski, A. *Comprehensive B₁₂: chemistry, biochemistry, nutrition, ecology, medicine*; De Gruyter: Berlin; New York, 1987.
288. Kräutler, B.; Arigoni, D.; Golding, B. T. *Vitamin B₁₂ and B₁₂-proteins (proceedings of the 4th European Symposium on Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins)*; Wiley-VCH: Weinheim; Chichester, 1998.
289. Banerjee, R. *Chemistry and Biochemistry of B₁₂*; Wiley-Interscience: Weinheim; New York, 1999.
290. Pratt, J. M. *Inorganic chemistry of vitamin B₁₂*; Academic Press: London, New York, 1972.
291. Babior, B. M., *J. Biol. Chem.*, **1969**, *244*, 2917.
292. Schepler, K. L.; Dunham, W. R.; Sands, R. H.; Fee, J. A.; Abeles, R. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1975**, *397*, 510.
293. Booker, S.; Licht, S.; Broderick, J.; Stubbe, J., *Biochemistry*, **1994**, *33*, 12676.
294. Harkins, T. T.; Grissom, C. B., *Science*, **1994**, *263*, 958.
295. Grissom, C. B.; Natarajan, E., *Methods Enzymol.*, **1997**, *281*, 235.
296. Zhao, Y.; Abend, A.; Kunz, M.; Such, P.; Retey, J., *Eur. J. Biochem.*, **1994**, *225*, 891.
297. Abend, A.; Illich, V.; Retey, J., *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *249*, 180.
298. Bothe, H.; Darley, D. J.; Albracht, S. P.; Gerfen, G. J.; Golding, B. T.; Buckel, W., *Biochemistry*, **1998**, *37*, 4105.
299. Taoka, S.; Padmakumar, R.; Grissom, C. B.; Banerjee, R., *Bioelectromagnetics*, **1997**, *18*, 506.
300. Medek, A.; Frydman, V.; Frydman, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 14237.
301. Hoffmann, B.; Konrat, R.; Bothe, H.; Buckel, W.; Krautler, B., *Eur. J. Biochem.*, **1999**, *263*, 178.
302. Tollinger, M.; Konrat, R.; Hilbert, B. H.; Marsh, E. N.; Krautler, B., *Structure*, **1998**, *6*, 1021.
303. Savage, H., *Biophys. J*, **1986**, *50*, 947.
304. Brown, K. L.; Cheng, S.; Zou, X.; Li, J.; Chen, G.; Valente, E. J.; Zubkowski, J. D.; Marques, H. M., *Biochemistry*, **1998**, *37*, 9704.

- 305. Drennan, C. L.; Matthews, R. G.; Ludwig, M. L., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1994**, *4*, 919.
- 306. Drennan, C. L.; Huang, S.; Drummond, J. T.; Matthews, R. G.; Ludwig, M. L., *Science*, **1994**, *266*, 1669.
- 307. Marsh, N.; Leadlay, P. F.; Evans, P. R., *J. Mol. Biol.*, **1988**, *200*, 421.
- 308. Mancina, F.; Keep, N. H.; Nakagawa, A.; Leadlay, P. F.; McSweeney, S.; Rasmussen, B.; Bosecke, P.; Diat, O.; Evans, P. R., *Structure*, **1996**, *4*, 339.
- 309. Mancina, F.; Smith, G. A.; Evans, P. R., *Biochemistry*, **1999**, *38*, 7999.
- 310. Mancina, F.; Evans, P. R., *Structure*, **1998**, *6*, 711.
- 311. Reitzer, R.; Krasser, M.; Jogl, G.; Buckel, W.; Bothe, H.; Kratky, C., *Acta Crystallogr., Sect. D*, **1998**, *54*, 1039.
- 312. Shibata, N.; Masuda, J.; Tobimatsu, T.; Toraya, T.; Suto, K.; Morimoto, Y.; Yasuoka, N., *Structure*, **1999**, *7*, 997.
- 313. Thoma, N. H.; Leadlay, P. F., *Protein Sci.*, **1996**, *5*, 1922.

2. BIOKATALÍTIKUS MÓDSZEREK SZINTETIKUS ALKALMAZÁSA

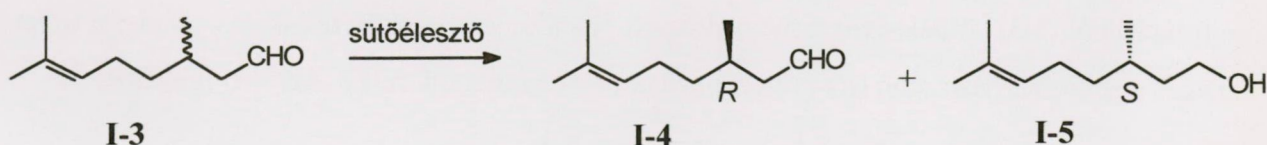
Az elmúlt több mint egy évtizedben egyik fő tudományos érdeklődési területem a biokatalízis szintetikus alkalmazása¹⁻³ volt. A királis szintézismódszerek iránti megnövekedett igény és a környezetvédelmi kérdések fokozatos előtérbe kerülése könnyen érthetővé teszi a módszer iránti érdeklődés robbanásszerű fejlődését, mivel a biokatalizátorok (enzimek, mikroorganizmusok) természetüknél fogva környezetbarát, királis katalizátorok. A biokatalitikus folyamatok terjedésének elősegítéséhez új vegyületcsaládokon preparatív léptékben vizsgáltuk a szelektív biokatalitikus eljárásokat és az így nyerhető hasznos intermedierek felhasználási területeit. A biokatalízissel nyert optikailag aktív intermediereket elsősorban királis feromonok⁴ szintézisében használtuk fel.

Az optikailag aktív vegyületeket eredményező biokatalitikus folyamatokban alapvetően kétféle szelektivitástípus használható fel (ld. 1.2.1. *Fejezet*)^{2,3}: az átalakításokat végezhetjük racém vegyületek *enantiomer szelektív* biotranszformációjával vagy prokirális ill. *mezo* vegyületek *enantiotóp szelektív* átalakításával. A továbbiakban a biokatalitikus folyamatok szintetikus célokra történő hasznosításával kapcsolatosan általunk elvégzett kutatási tevékenységet ennek megfelelően nem időrendi csoportosításban, hanem a biokatalízis során megnyilvánuló szelektivitások típusa szerinti beosztásban mutatom be.

2.1. RACÉM VEGYÜLETEK ENANTIOMER SZELEKTIV ÁTALAKÍTÁSAI

2.1.1. Racém citronellál enantiomer szelektív redukciója sütőélesztővel

Sütőélesztő alkalmazásával, racém citronellálból (**I-3**) kiindulva enantiomer szelektív redukciós eljárást dolgoztunk ki. (**I. melléklet**⁵). A folyamatban nyert magas enantiomertisztaságú (*R*)-(+)-citronellált (**I-4**) szintetikus eljárásokban használtuk fel⁵, valamint az optikailag aktív citronellol (**I-5**) enantiomerek ill. acetátjaik ciklodextrin komplexeit termikus analízissel is vizsgáltuk⁶.



A lombosfa fehérharmoly (*Leucoptera scitella*, Zeller) Közép- és Dél-Európa a Közel-Kelet és Közép-Ázsia, valamint Kína egyes kontinentális területein előforduló növénykártevő. Fő kártételét alma és körteültetvényeken fejti ki.

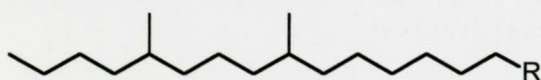


A kifejlett lepke



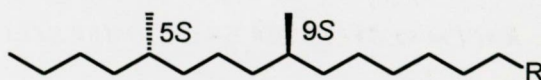
A lombosfa fehérharmoly kártétele almán

A lombosfa fehérharmoly (*Leucoptera scitella*, Zeller) és a kávéharmoly (*Perileucoptera coffeella*) fő szex-feromon komponensei az 5,9-dimetilheptadekán (**I-1a**) és az 5,9-dimetilpentadekán (**I-1b**).



I-1a, R = C₂H₅

I-1b, R = H

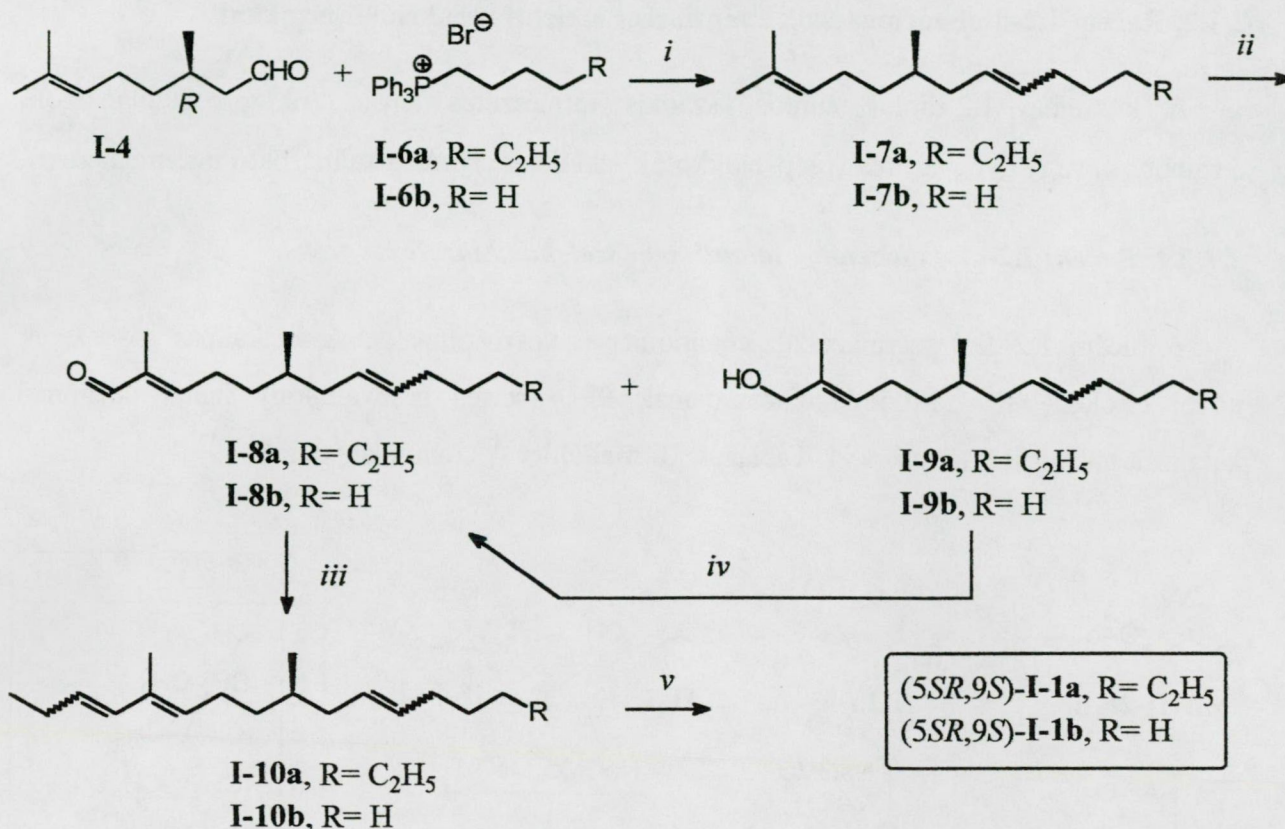


(5*S*,9*S*)-**I-1a**, R = C₂H₅

(5*S*,9*S*)-**I-1b**, R = H

Bár a természetes feromonban az (5*S*,9*S*)-izomer fordul elő, szabadföldi tesztek során a négy lehetséges sztereoizomert tartalmazó készítmény is aktívnak bizonyult ⁷. A feromon (**I-1a**) racém izomerkeverék formában történő előállítását többen megvalósították ⁸⁻¹¹.

A lombosfa fehérharmoly és a kávéharmoly feromonjának optikailag aktív diasztereomerkeverék formában történő [(5*SR*,9*S*)-**I-1a** és (5*SR*,9*S*)-**I-1b**] előállítására kiindulási anyagként racém citronellálból (**I-3**) sütőélesztővel megvalósított enantiomer szelektív redukciós eljárással nyert magas enantiomertisztaságú (*R*)-(+)-citronellált (**I-4**) használtuk fel (7. Ábra; **I. melléklet** ⁵).



7. Ábra A lombosfa fehérmoly és kávémosoly szex-feromonok [(5SR,9S)-I-1a és (5SR,9S)-I-1b] szintézise

Reagensek: i.) NaOEt, toluol, az etanol azeotrop desztillációja, majd I-4 adagolás -50 °C, szobahő, 2 óra; ii.) SeO₂, EtOH, reflux, 3 óra; iii.) *n*-Pr(Ph)₃P⁺Br⁻, NaOEt, toluol, az etanol azeotrop desztillációja, majd I-8a ill. I-8b adagolás -50 °C, szobahő, 3 óra; iv.) PDC, CH₂Cl₂, szobahő, 2 óra; v.) 10 % Pd/C, H₂, MeOH-EtOAc.

A fermentáló élesztővel végzett redukcióban reagálatlanul visszamaradt (*R*)-(+)-citronellált (I-4) kapcsoltuk a megfelelő ilidekkel (I-6a ill. I-6b). A keletkezett diéneket (I-7a ill. I-7b, *E/Z* izomerek kb. 3:2 elegye) szelén dioxiddal oxidálva aldehidek (I-8a ill. I-8b) és allil alkoholok (I-9a ill. I-9b) elegyéhez jutottunk, melyek közül az utóbbiakat jó termeléssel ugyancsak aldehiddé tudtuk alakítani. A propiltrifenilfoszfónium bromidból képzett ilid és az aldehidek (I-8a ill. I-8b) Wittig-kapcsolása a feromonok telítetlen prekursorait (I-10a ill. I-10b) eredményezte, melyekből katalitikus hidrogénezéssel jutottunk a telített feromonokhoz [(5SR,9S)-I-1a és (5SR,9S)-I-1b].

Szintézisünk ⁵ közlése után a lombosfa fehérmoly természetes sztereoizomerjének [(5SR,9S)-I-1a] előállítását is leírták ¹².

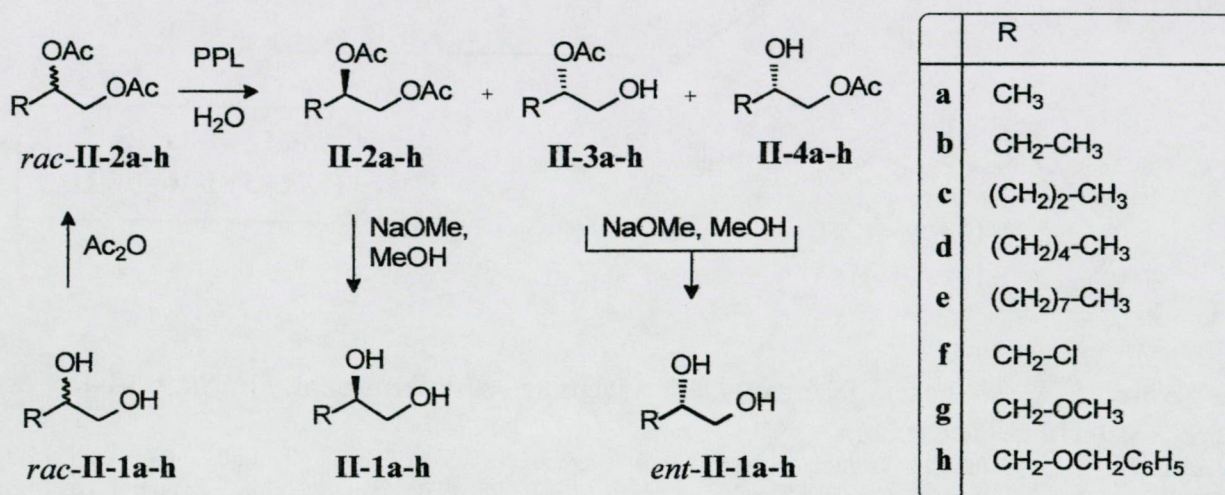
5S, 9S
 full syn

2.1.2. Racém 1,2-diolszármazékok enantiomer szelektív reakciói lipázokkal

A különféle 1,2-diolok fontos, számos természetes anyag (pl. proszttaglandinok, feromonok) vagy gyógyszerek (pl. β -blokkolók) előállítása során alkalmazható intermedierek.

2.1.2.1. Racém 1,2-diol diacetátok enantiomer szelektív hidrolízise

A racém 1,2-diol származékok enantiomer szelektív átalakítására alkalmas módszerek közül elsőként az 1,2-diolok diacetátjainak PPL (sertés hasnyálmirigy lipáz) enzimmel katalizált hidrolízisét (8. Ábra, 4. Táblázat, II. melléklet ¹³) tanulmányoztuk:



8. Ábra 1,2-diol diacetátok lipáz-katalizált enantiomer szelektív hidrolízise

Racém alkoholszármazékok szerves közegben végzett enzimatis acilezése esetén gyakori, hogy az enantiomer szelektivitás mértéke a megfelelő észter vizes közegben végrehajtott hidrolíziséhez képest magasabb ³. Az általunk vizsgált 1,2-diol diacetátok (*rac*-II-2a-h) körében azonban a helyzet ettől eltérőnek bizonyult (4. Táblázat).

A vizsgált vegyületek közül a *rac*-II-2a,b,c,e diacetátok hidrolízisekor tapasztalt szelektivitás számottevően meghaladta a megfelelő racém diolok (*rac*-II-1a,b,c,e) metil propionáttal szerves közegben végzett acilezésekor ¹⁴ észlelteket. Mindezek mellett pl. a *rac*-II-2d PPL enzim-katalizált hidrolízise legalább egy nagyságrenddel gyorsabbnak bizonyult, mint a megfelelő diol (*rac*-II-1d) ugyanolyan mennyiségű enzimmel és etil-acetáttal ill. metil-propionáttal végzett acilezése.

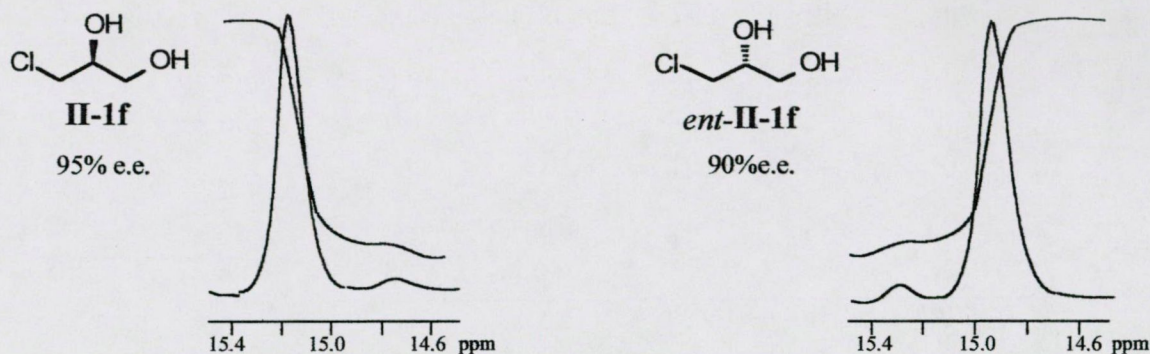
4. Táblázat 1,2-Diol diacetátok (*rac*-II-2a-h) lipáz-katalizált enantiomer szelektív hidrolízise ^a

Szubsztrát <i>rac</i> -II-2	Konv. %	II-2, Term. ^b %	II-1 ^c , E.t. %	II-1, Konfig.	II-3:II-4 Arány ^d	II-3+II-4, Term. ^b %	<i>ent</i> -II-1 ^c , E.t. %
a	50	75	28	<i>R</i>	0.62	64	24
	30				0.45	61	30
	70 ^e	49	52	<i>R</i>			
b	50	58	72	<i>R</i>	1.1	67	69
	30				1.0	86	82
	70 ^e	48	91	<i>R</i>			
c	50	77	81	<i>R</i>	2.2	80	76
	30				2.5	86	85
	70 ^e	48	>96	<i>R</i>			
d	50	78	72	<i>R</i>	0.57	72	56
	30				0.64	80	68
	70 ^e	68	80	<i>R</i>			
e	50	73	77	<i>R</i>	0.75	71	62
	30				0.81	77	78
	70 ^e	70	92	<i>R</i>			
f	50	81	58	<i>S</i>	4.4	75	55
	30				4.0	68	68
	70 ^e	57	87	<i>S</i>			
g	50	75	54	<i>S</i>	4.3	54	49
	30				4.4	50	75
	70 ^e	54	92	<i>S</i>			
h	50	81	51	<i>S</i>	1.7	73	55
	30				1.7	75	57
	70 ^e	63	61	<i>S</i>			

^a **Reakciókörülmények:** 5-20 mg PPL/mmol szubsztrát, víz, pH=7.5, szobahőfok, 0,2-3 óra (részletek: ld. II. melléklet); ^b A feltüntetett konverzióknak megfelelő reakcióból elválasztás után nyert izolált termék; ^c ¹H-NMR és Eu-shift reagens alkalmazásával és/vagy irodalmi forgatásértékekhez hasonlítva (részletek: ld. II. melléklet); ^d Az izomerarányt a II-3+II-4 elegyek ¹H-NMR spektrumában található CO-CH₃, -CH₂-O és CH-O jelek arányaiból határoztuk meg; ^e A 30% konverzióig vezetett reakcióból elválasztott diacetát frakciót II-2 az eredeti szubsztrátra vonatkoztatott 70 % konverzióknak megfelelő mértékig tovább hidrolizáltuk.

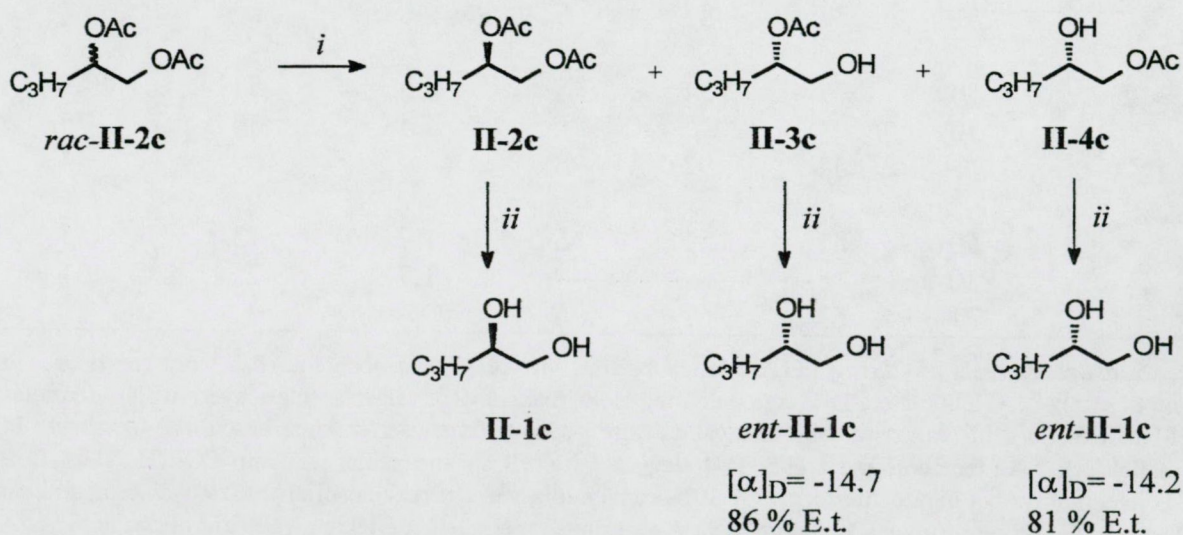
Míg a megfelelő racém diolok (*rac*-**II-1**) enzimatiskus acilezése igen magas regioszelektivitással főként a primer hidroxicsoprot acilezett származékát eredményezi ¹⁴, a monoacetát regioizomerek (**II-3** ill. **II-4**) aránya az enzimatiskus hidrolízis során erőteljesen függ a diacetát (*rac*-**II-2**) konstitúciójától (4. Táblázat, 6. oszlop).

A 4. Táblázat adataiból látható, hogy a konverzió változtatásával a termékek, főleg a visszamaradó diacetát frakciók (**II-2**) magas enantiomer tisztasággal nyerhetők (9. Ábra).



9. Ábra PPL hidrolízissel különböző konverzióánál nyert 3-klórpropán-1,2-diol enantiomerek (**II-1f** ill. *ent*-**II-1f**) Eu-shift reagens jelenlétében felvett ¹H-NMR spektrumrészletei

Az 1,2-pentándiol diacetát (*rac*-**II-2c**) PPL-katalizált hidrolízisének részletes analízise (10. Ábra) azt mutatta, hogy a regioszelektivitás hiánya nincs számottevő hatással az enantiomer tisztaságra, mivel mindkét regioizomer monoacetát (**II-3** ill. **II-4**) gyakorlatilag azonos enantiomer tisztasággal képződött.

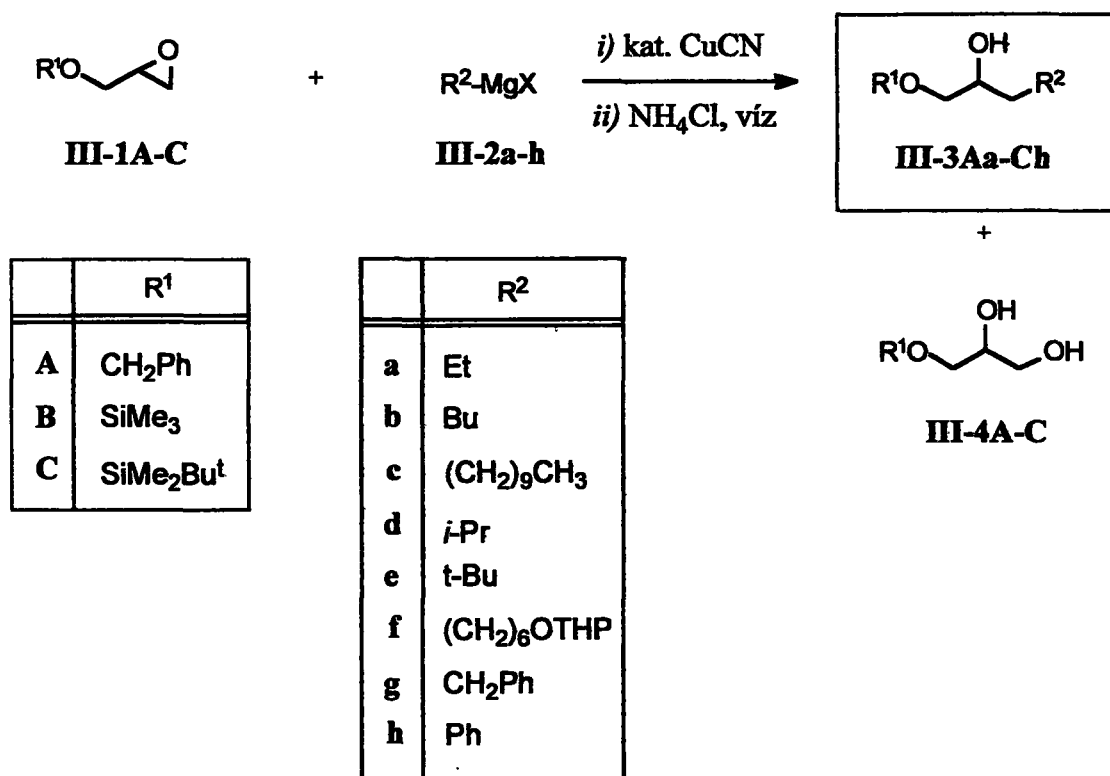


10. Ábra Regioszelektivitás - enantiomer szelektivitás korreláció a PPL hidrolízis során
Reagensek: i.) PPL, H₂O, pH 7, RT, 30% konverzió; ii.) kat. NaOMe, MeOH, RT.

2.1.2.2. Racém 1,2-diolok 2-acetátjainak enantiomer szelektív acetilezése

Az 1,2-diolszármazékok enantiomer szelektív biotranszformációinak tanulmányozása során vizsgálatokat végeztünk 1,2-diolok 2-acetátjainak lipáz-katalizált acetilezésére ¹⁵⁻¹⁷.

Az 1,2-diolok körében tervezett további vizsgálatainkhoz szükség volt egy, a 2-acetátok előállítására alkalmas eljárás kidolgozására. Ehhez a védett glicidolok (III-1A-C) és Grignard vegyületek (III-2Aa-Ch) közti gyűrűfelyülés-kapcsolás folyamaton alapuló, rugalmasan változtatható és alkalmazható módszert dolgoztunk ki 1-helyzetben védett 1,2-diol-származékok (III-3Aa-Ch) előállítására (11. Ábra, 5. Táblázat, III-melléklet ¹⁸).



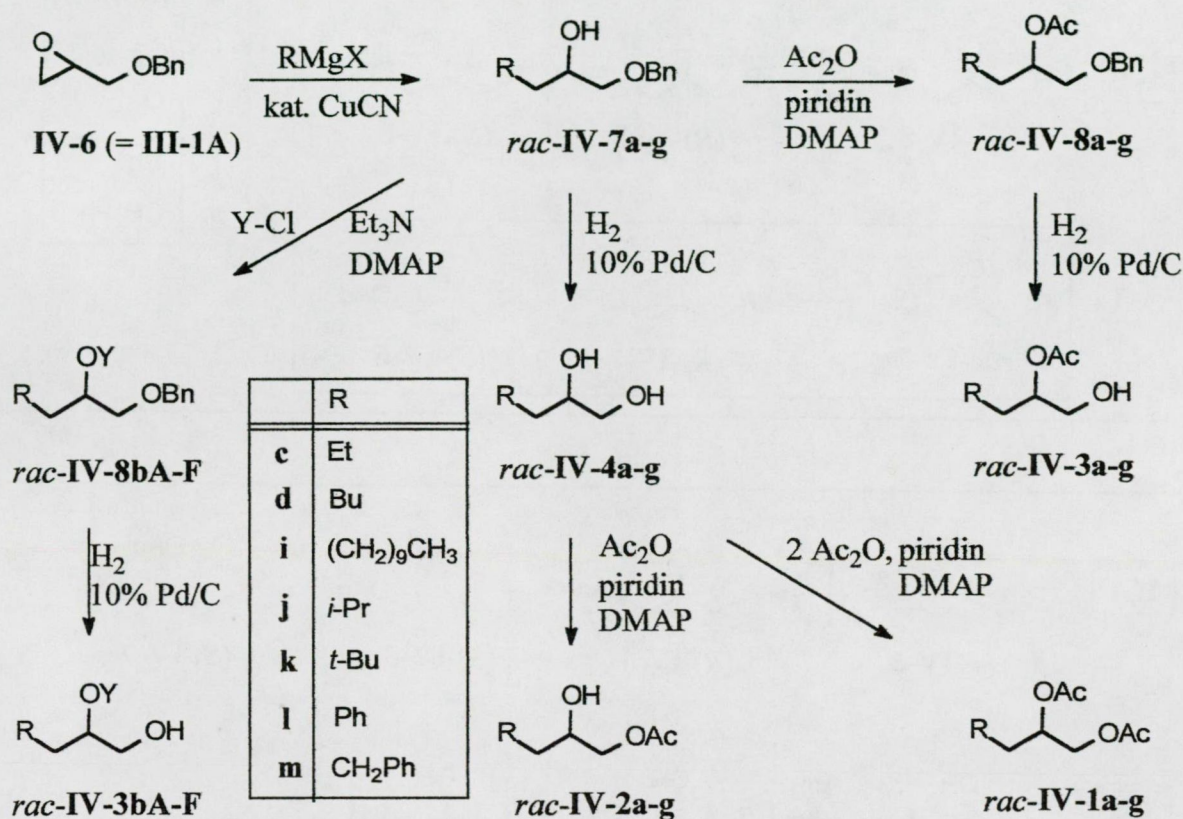
11. ábra 1,2-diolszármazékok előállítása védett glicidolszármazékok Grignard reagensekkel végzett gyűrűfelyítés / kapcsolási reakciójával

5. Táblázat Védett glicidolszármazékok (III-1) reakciója Grignard reagensekkel (III-2)

Eset	III-1	III-2	Körülmények ^a					III-3	(III-4) ^b
			X	Oldószer ^c ; CuCN [equiv.]	Hőfok [°C]	Idő [min]	Termelés [%]		
1	A	a	Br	Me-THF 0.02	-15	15	89		
2	A	b	Br	Me-THF 0.02	-15	15	87	(5)	
3	A	c	Br	Me-THF 0.02	-15	15	80	(9)	
4	A	d	Br	Me-THF 0.02	-15 - RT	120	44	(46)	
5	A	e	Cl	Me-THF 0.02	-15	15	61	(20)	
6	A	f	Br	Me-THF 0.02	-15 - RT	120	65	(6) ^d	
7	A	g	Cl	Me-THF 0.02	-15	15	88	(3)	
8	A	h	Br	Me-THF 0.02	-15	15	85	(4)	
9	B	a	Br	Me-THF 0.02	-15	15	83		
10	B	b	Br	Me-THF 0.02	-15	15	82	(7)	
11	B	c	Br	Me-THF 0.02	-15	15	71	(9)	
12	B	d	Br	Me-THF 0.02	-15 - RT	120	57	(24)	
13	B	e	Cl	Me-THF 0.02	-15	15	58	(19)	
14	B	f	Br	Me-THF 0.02	-15 - RT	60	59	(13) ^d	
15	B	g	Cl	Me-THF 0.02	-15	15	87		
16	B	h	Br	Me-THF 0.02	-15	15	88		
17	C	a	Br	Me-THF 0.02	-15	15	93		
18	C	b	Br	Et ₂ O 0.02	-15	15	75	(12)	
19	C	b	Br	THF 0.02	-15	15	88		
20	C	b	Br	THF 0	-15	15	^e		
21	C	b	Br	THF 0.25	-15	15	^e		
22	C	b	Br	THF 0.02	0 - RT	120	54	(38)	
23	C	b	Br	Me-THF 0.02	-15	15	92		
24	C	c	Br	Me-THF 0.02	-15	15	79	(12)	
25	C	d	Br	Me-THF 0.02	-15	120	62	(29)	
26	C	e	Cl	Me-THF 0.02	-15	15	65	(18)	
27	C	f	Br	Me-THF 0.02	-15	120	63	(9) ^f	
28	C	g	Cl	Me-THF 0.02	-15	15	89		
29	C	h	Br	Me-THF 0.02	-15	15	91		

^a A Grignard reagensek előállításának és a reakciókörülmények részletezéséhez ld. III-melléklet; ^b Preparatív oszlopkromatográfiával (szilikagél) izolált termékek termelése. Ahol zárójelben nincs megadva a melléktermék (III-4) termelése, ott kizárólag a főtermék (III-3) képződött; ^c Me-THF: 2-metiltetrahydrofuran; ^d A diol (III-4) melléktermék mellett további azonosítatlan melléktermékek képződését észleltük; ^e VRK vizsgálatok alacsony konverziót és összetett termékelegy képződését mutatták.

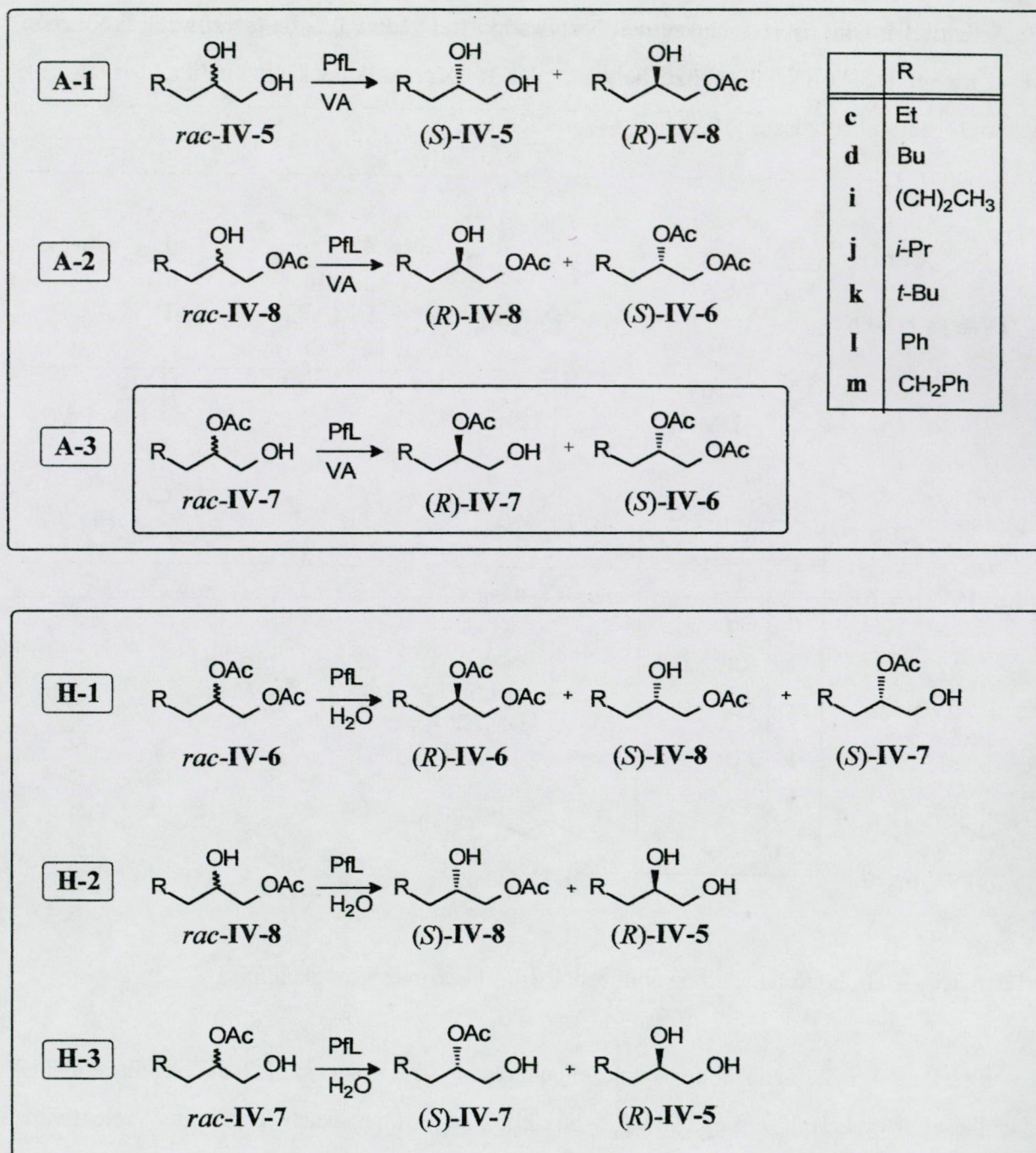
A fenti eljárással nyert 1-helyzetben benzilcsoporttal védett 1,2-diol származékokból mód nyílt a racém 1,2-diolk különböző helyen acilezett származékainak enzimatis vizsgálatok céljából történő előállítására (12. Ábra, IV. melléklet¹⁵).



12. Ábra Különböző helyzetben acilezett 1,2-diol származékok előállítása

Ezzel mód nyílt azon feltevésünk ellenőrzésére, miszerint az 1,2-diolk diacetátjainak hidrolízisekor tapasztalt, a megfelelő 1,2-diolkhoz képesti magasabb enantiomer szelektivitást (2.1.2.1 fejezet, II. melléklet¹³) a diacetátok 2-es helyzetben található nagyobb térigényű és viszonylag apolárisabb szubsztituens jelenléte okozza; így feltételezhetően az 1,2-diol származékok enzimatis reakciói során a legmagasabb enantiomer szelektivitás a "2-acetátok" (rac-IV-3a-g) acilezése során várható.

Az enzim és reakciókörülmények kiválasztása után (IV. melléklet¹⁵) két 1,2-diol származék soron (rac-IV-1-4b,d) összehasonlítottuk a lehetséges acetilezéseket (A-1: diol, A-2: primer-, ill. A-3: szekunder monoacetát acetilezése) és hidrolíziseket (H-1: diacetát, H-2: primer-, ill. H-3: szekunder monoacetát hidrolízise) (13. Ábra, 6. Táblázat).



13. Ábra 1,2-Diol származékok lipáz-katalizált hidrolízise és acilezése

Vizsgálataink (6. Táblázat) mindkét származék soron (*rac*-IV-1-4b,d) igazolták feltevésünket, mindkét esetben a 2-acetátok enzimatis acilezése zajlott a legmagasabb enantiomer szelektivitással (*rac*-IV-3b: E = 3.6; ill. *rac*-IV-3d: E > 100). Ezen túlmenően ez az acilezési folyamat (A-3) bizonyult a legyorsabbnak is.

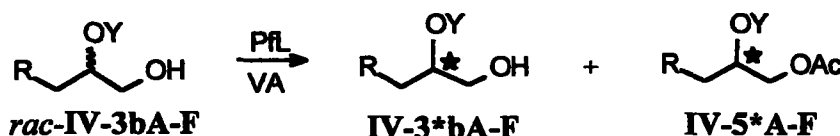
6. Táblázat 1,2-Diol származékok (*rac*-IV-1-4a,b) lipáz-katalizált hidrolízisek (Módszerek: H-1,2,3) és acetilezések (Módszerek: A-1,2,3) enantiomer szelektivitása

Szubsztrát	Módszer ^a	Idő (óra)	Konv. (%)	Sz. ^b		E _{SP} ^d	T. ^c	
				T. (%)	E.t.(%)		T. (%)	E.t.(%)
<i>rac</i> -IV-1b	H-1	0.66	51	40	15	1.5	36	13
<i>rac</i> -IV-2b	H-2	3.15	53	45	13	1.5	46	14
<i>rac</i> -IV-3b	H-3	5.3	63	15	22	1.3	49	5
<i>rac</i> -IV-4b	A-1	0.75	24	67	3	1.2	21	9
<i>rac</i> -IV-2b	A-2	432	44	52	28	2.6	41	34
<i>rac</i> -IV-3b	A-3	1.33	55	39	49	3.6	48	40
<i>rac</i> -IV-1d	H-1	3.3	39	45	30	2.5	42	32
<i>rac</i> -IV-2d	H-2	13	20	64	0	1.1	14	4
<i>rac</i> -IV-3d	H-3	25	24	60	1	1.1	21	5
<i>rac</i> -IV-4d	A-1	3	51	44	32	2.6	46	31
<i>rac</i> -IV-2d	A-2	192	29	59	22	3.3	24	46
<i>rac</i> -IV-3d	A-3	1.75	41	53	57	>100	37	99

^a *Módszerek* (ld. 12. Ábra): H-1,2,3: Racém szubsztrát (1 mmol), Pfl (5 mg), kevertetés vízben szobahőfokon a pH értékének 0.05 M NaOH oldat segítségével történő 7.2 értéken tartásával; A-1,2,3: Racém szubsztrát (1 mmol), Pfl (5 mg), kevertetés szobahőfokon vinil acetát (1 ml) és hexán (1 ml) elegyében. A termékeket szilikagélén történő kromatográfiával választottuk el. ^b Sz.: A racém szubsztrát reagálatamul visszamaradt része; ^c Az enantiomer szelektivitás mértékére jellemző E értékeket (E_{SP}) a szubsztrát (Sz) és termék frakciók (T) enantiomer tisztaságát tartalmazó egyenlet ¹⁹ segítségével határoztuk meg. A termék és a szubsztrát frakciók enantiomer tisztaságát a megfelelő diolokká hidrolizálva Eu-shift reagensekkel végzett ¹H-NMR mérések ill. optikai forgatás mérések segítségével határoztuk meg; ^d T.: Az enzimátikus átalakítás terméke(i).

A 2-es helyen lévő acilcsoport enantiomer szelektivitásra gyakorolt szerepének tisztázása érdekében megvizsgáltuk néhány további szekunder monoacetát (*rac*-IV-3bA-F) acetilezését Pfl (*Pseudomonas fluorescens* lipáz) és vinil-acetát segítségével (A-3 módszer).

7. Táblázat



Y	Idő ^a (óra)	Konv. (%)	IV-3b*A-F		IV-5*A-F			E _{SP} ^b
			T.(%)	E.t.(%)	T.(%)	Konfig.	E.t.(%)	
A acetil	1.3	55	39	49	48	S	40	3.6
B propionil	4	31	55	20	25	S	43	3.0
C trifluóracetil	120	32	57	19	26	S	41	2.9
D fenilacetil	2.1	34	61	6	31	S	6	1.4
E benzoil	3.5	49	45	0	43		0	1.0
F pivaloil	4	45	53	6	42	R	4	1.1

^a Racém szubsztrát (*rac*-IV-3bA-F, 1 mmol), Pfl (5 mg), kevertetés szobahőfokon vinil acetát (1 ml) és hexán (1 ml) elegyében. ^b Az E értéket a szubsztrát és termék frakciók enantiomer tisztaságát tartalmazó egyenlet ¹⁹ segítségével határoztuk meg (ld. 6. Táblázat).

Mivel a 2-acil csoport szelektivitásra gyakorolt hatásának vizsgálata szerint (7. Táblázat) a legmagasabb enantiomer szelektivitás a 2-acetilezett vegyület esetében nyilvánult meg, a továbbiakban egyéb 2-acetilezett 1,2-diolok (*rac*-IV-3a-g) Pfl (*Pseudomonas fluorescens* lipáz) és vinil-acetát segítségével végzett acilezését vizsgáltuk (8. táblázat).

8. Táblázat 2-Acetilezett 1,2-diolok (*rac*-IV-3a-g) Pfl-katalizált acetilezése

$ \begin{array}{c} \text{OAc} \\ \\ \text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array} \xrightarrow[\text{VA}]{\text{Pfl}} \begin{array}{c} \text{OAc} \\ \\ \text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array} + \begin{array}{c} \text{OAc} \\ \\ \text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OAc} \end{array} $								
<i>rac</i> -IV-3a-g			<i>(R)</i> -IV-3a-g		<i>(S)</i> -IV-1a-g			
R	<i>Idő</i> ^a (óra)	<i>Konv.</i> (%)	<i>(R)</i> -IV-3		<i>(S)</i> -IV-1		<i>E</i> _{SP} ^b	
			T.(%)	E.t.(%)	T.(%)	E.t.(%)		
a	etil	2.25	42	32	48	23	60	7.0
b	<i>n</i> -butil	1.3	55	39	49	48	40	4.4
c	<i>n</i> -decil	8	40	41	42	27	54	4.5
d	<i>i</i> -propil	1.75	41	53	57	37	>98	>100
e	<i>t</i> -butil	3.3	43	52	81	39	>98	>100
f	fenil	3	38	57	67	34	>98	>100
g	benzil	9	51	43	42	46	44	3.8

^a Racém szubsztrát (*rac*-IV-3a-g, 1 mmol), Pfl (5 mg), kevertetés szobahőfokon vinil acetát (1 ml) és hexán (1 ml) elegyében. ^b Az E értéket a szubsztrát és termék frakciók enantiomer tisztaságát tartalmazó egyenlet¹⁹ segítségével határoztuk meg (ld. 6. Táblázat).

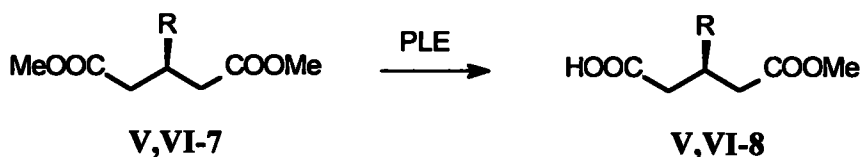
Az eredményekből látható (IV. melléklet, 8. táblázat¹⁵), hogy 2-acetilezett 1,2-diolok (*rac*-IV-3a-g) Pfl (*Pseudomonas fluorescens* lipáz) és vinil-acetát segítségével végzett acilezése során a nagyobb térkitöltésű szubsztituenseket tartalmazó 2-acetátok (*rac*-IV-3d-f) magas szelektivitással acetilezhetők, egy lépésben enantiomertiszta termékeket [(*R*)-IV-3d-f: E.t. > 95 %] szolgáltatva, míg a többi modellen az enantiomer szelektivitás mértéke közepes / jó.

2.2. PROKIRÁLIS VEGYÜLETEK ENANTIOTÓP SZELEKTIV ÁTALAKÍTÁSAI

2.2.1. Prokirális 3-szubsztituált dimetil glutarátok enzimatiszus hidrolízise

Munkánk során tanulmányoztuk egy sor prokirális 3-szubsztituált dimetil glutarát (V,VI-7) sertés máj észteráz enzim (PLE) által katalizált enantiotóp szelektív hidrolízisét és a termékek (V,VI-8) alkalmazhatóságát (V. melléklet ²⁰, VI. melléklet ²¹; 9. Táblázat).

9. Táblázat Prokirális 3-szubsztituált dimetil glutarátok (V,VI-7) enzimatiszus hidrolízise



R	Diészter	Monoészter ^a	Termelés (%)	E.t. (%)
CH ₃	V-7	V-8		85 ^b
OTBDMS ^c	VI-7a	VI-8a	85	52 ^c
OAc	VI-7b	VI-8b	45	90
OCH ₂ OCH ₃	VI-7d	VI-8d	65	0
OCOCH ₂ Ph	VI-7e	^d	^d	-

^a *Tipikus reakció:* prokirális diészter szubsztrát (V,VI-7, 20 mmol), PLE (10 g), kevertetés foszfát pufferben (100 ml) szobahőfokon a pH értékének 2.78 M NaOH oldat segítségével történő adott (7.2 ill. 8.0) értéken tartásával. Reakcióidő: 4 - 72 óra; ^b A termék monoészter L-cinkonidinnel vízből átkristályosítva, majd sójából felszabadítva 64 % termeléssel enantiomer tiszta terméket adott; ^c OTBDMS: *tert*-butildimetilsziloxi; A termék konfigurációja az ábrán feltüntetettel ellentétes volt; ^d A hidrolízis komplex, főként dimetil 3-hidroxiglutarátot tartalmazó elegyet eredményezett.

A 9. Táblázatban feltüntetett folyamatok közül a dimetil 3-metilglutarát (V-7) PLE-katalizált hidrolízise vizsgálódásaink során már ismert volt ²²⁻²⁶, a tiszta PLE enzimmel különböző körülmények között végzett folyamat 79-97 %ee közötti enantiomer tisztaságú félésztert (V-8) eredményezett. Eljárásunkban az újszerű vonást az jelentette ^{4,20}, hogy a folyamat 1.8 mólnyi méretben 213 g desztillált végterméket (V-8) szolgáltató megvalósítása során olcsó, saját készítésű, acetonnal szárított májkészítményt alkalmaztunk. Ugyancsak növelte a folyamat használati értékét, hogy a termék enantiomertisztaságát egyszerű, L-cinkonidinnel vízből 64 % kihozattal végzett kristályosítással közel 100 %-osra növeltük.

A 9. Táblázatban feltüntetett folyamatok közül a 3-as helyzetben különféleképpen védett dimetil 3-hidroxiglutarát származékok (VI-7a-e) enzimkatalizált hidrolízisének vizsgálatát már korábban megkezdtük ²⁷, e területen egy másik kutatócsoport velünk párhuzamosan az általunk elértekhez (VI. melléklet ²¹; 9. Táblázat) igen hasonló eredményekre jutott ²⁸.

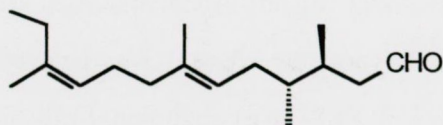
2.2.1.1. A (+)-faranál és a (+)-13-norfaranál szintézise (V. melléklet ²⁰)

A fáraóhangya (*Monomorium pharaonis*, L.) 2-3 mm-es vékony testalkatú vöröses-sárga, a többi hangyafajtól eltérő faji bélyegekkel rendelkező hangyafaj. Ezt az eredetileg szubtrópusi tájakon honos hangyafajt sok helyre széthurcolták, az utóbbi időben Magyarországon is rohamosan terjed. Közép-Európában szabadban nem tud megélni, az egyenletesen meleg épületekben (lakótelepi lakások fűtőcsövei mentén, pékségekben, kórházakban) alakítja ki kolóniáit. Kártételük abban áll, hogy táplálék után kutatva mindent összemásznak, élelmiszerekbe belerágnak, és különösen kórházi környezetben egyes, pl. *Staphylococcus*-fertőzésekért is felelőssé tehetők.



Mivel a dolgozók pusztulása, számuk csökkenése a kolónia szaporodási ütemét gyorsító jel, az ellenük való védekezés olyan szerekek lehetséges, melyeket a dolgozók a bolyba behurcolnak és azok az ott élő egyedekre, főként az anyára is hatással vannak. Ilyen korszerű szerek pl. a juvenilhormon készítmények, melyek a bábozódási folyamat gátlásával megállítják a boly szaporodását. E készítmények alkalmazása kapcsán merült fel annak a gondolata, hogy ezek kombinálhatók a hangyák nyomjelző anyagaival ²⁹, melyek a táplálékhoz vezető út megjelölésére szolgálnak.

A fáraóhangya nyomjelző feromonjának izolálása és szerkezetmeghatározása során ^{30,31} aktív főkomponensnek (+)-faranál (**V-1a**) bizonyult.

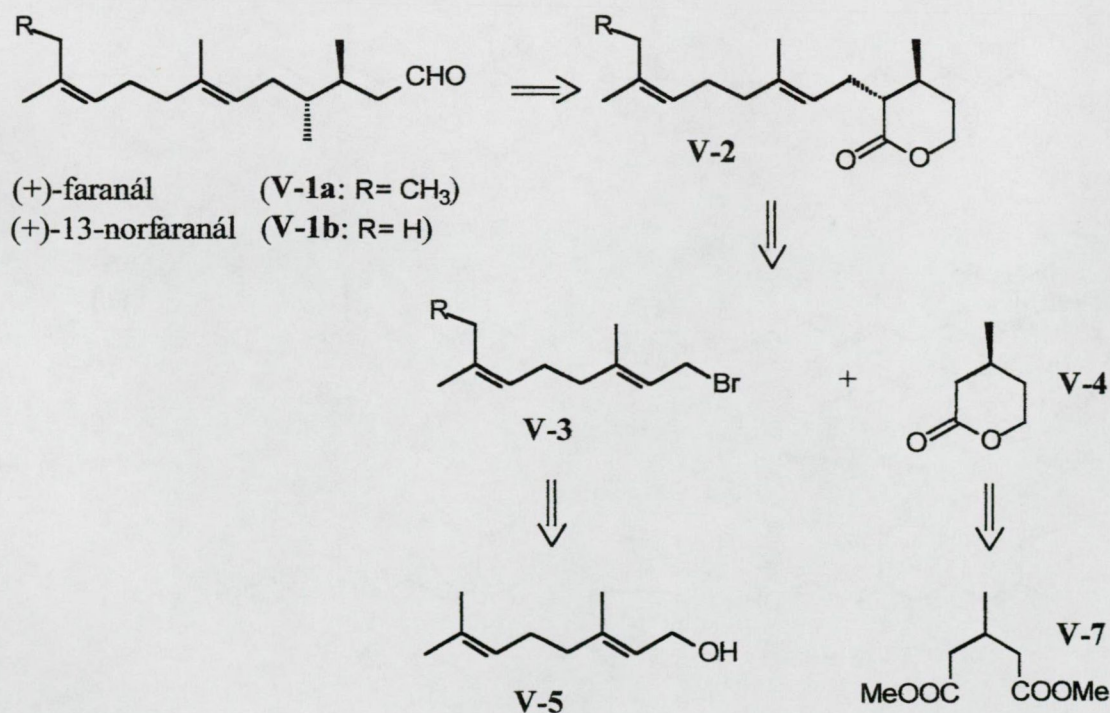


(+)-faranál (**V-1a**)

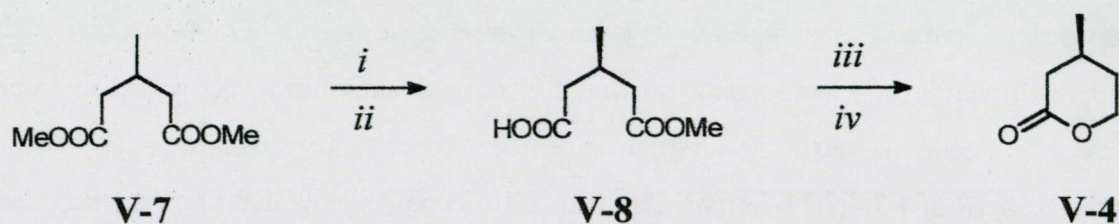
Szerkezet - hatás összefüggések ³¹ eredményei szerint a 3-as és 4-es helyen lévő metilcsoportok térállása jelentős hatással van a biológiai aktivitásra (pl. a racém faranál aktivitása kb. tizede az aktív 3*S*,4*R*-enantiomeréhez képest). Ugyanakkor a (3*S*,4*R*)-13-norfaranál [(3*S*,4*R*,6*E*)-3,4,7,11-tetrametildodeka-6,10-diénál] biológiai aktivitása megközelíti a természetes feromonét.

A faranál racém formában ^{32,33} történő szintézise ismert volt. A szerkezetigazolásra szolgáló, optikailag aktív terméket szolgáltató szintézisek ^{30,31} nem voltak alkalmasak preparatív léptékű előállításra. A nagyobb léptékű, optikailag aktív faranált [(3*S*,4*R*,6*E*,10*Z*)-3,4,7,11-tetrametiltrideka-6,10-diénál] eredményező eljárások ^{34,35} hosszadalmasak voltak és kémiai rezolválást tartalmaztak. Előzetes kísérleteink során megoldottuk az optikailag aktív, ám 4*S*-diasztereomerrel szennyezett faranál szintézisét ³⁶. A (+)-faranál (V-1) jelen fejezetben leírt szintézisét követően még egy, a 3*S*,4*R*-izomer előállítására alkalmas eljárást közöltek ³⁷.

Retroszintetikus analízisünknek megfelelően (14. Ábra, V. melléklet ²⁰) a prokirális diészterből (V-7) enzimatisz hidrolízissel nyerhető (3*R*)-hidrogén-metil 3-metilglutarát (V-8) szolgált alapul a (+)-faranál (V-1a) és a (+)-13-norfaranál (V-1b), a fáraóhangya nyomjelző feromonja és dezmetil analogonja sztereoszelektív szintéziséhez. ^{4,20}



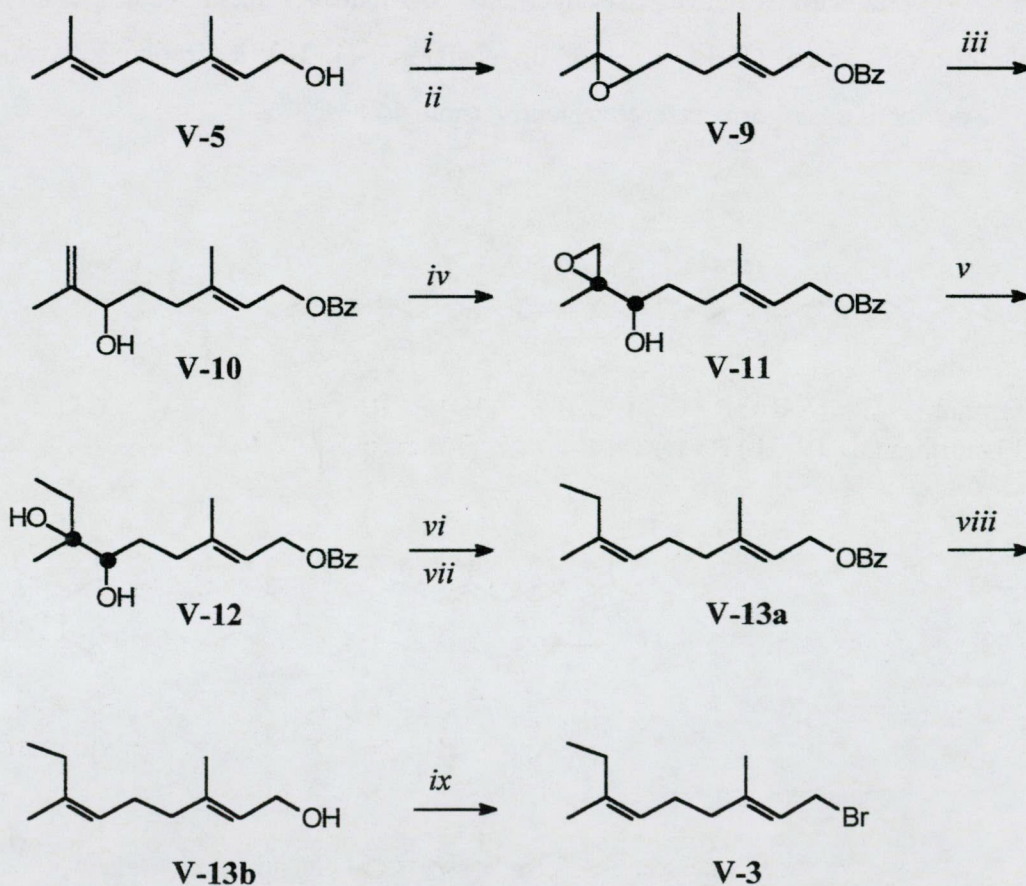
14. Ábra A (+)-faranál és (+)-13-norfaranál előállításának retroszintetikus analízise



15. Ábra Az optikailag aktív lakton (**V-4**) előállítása

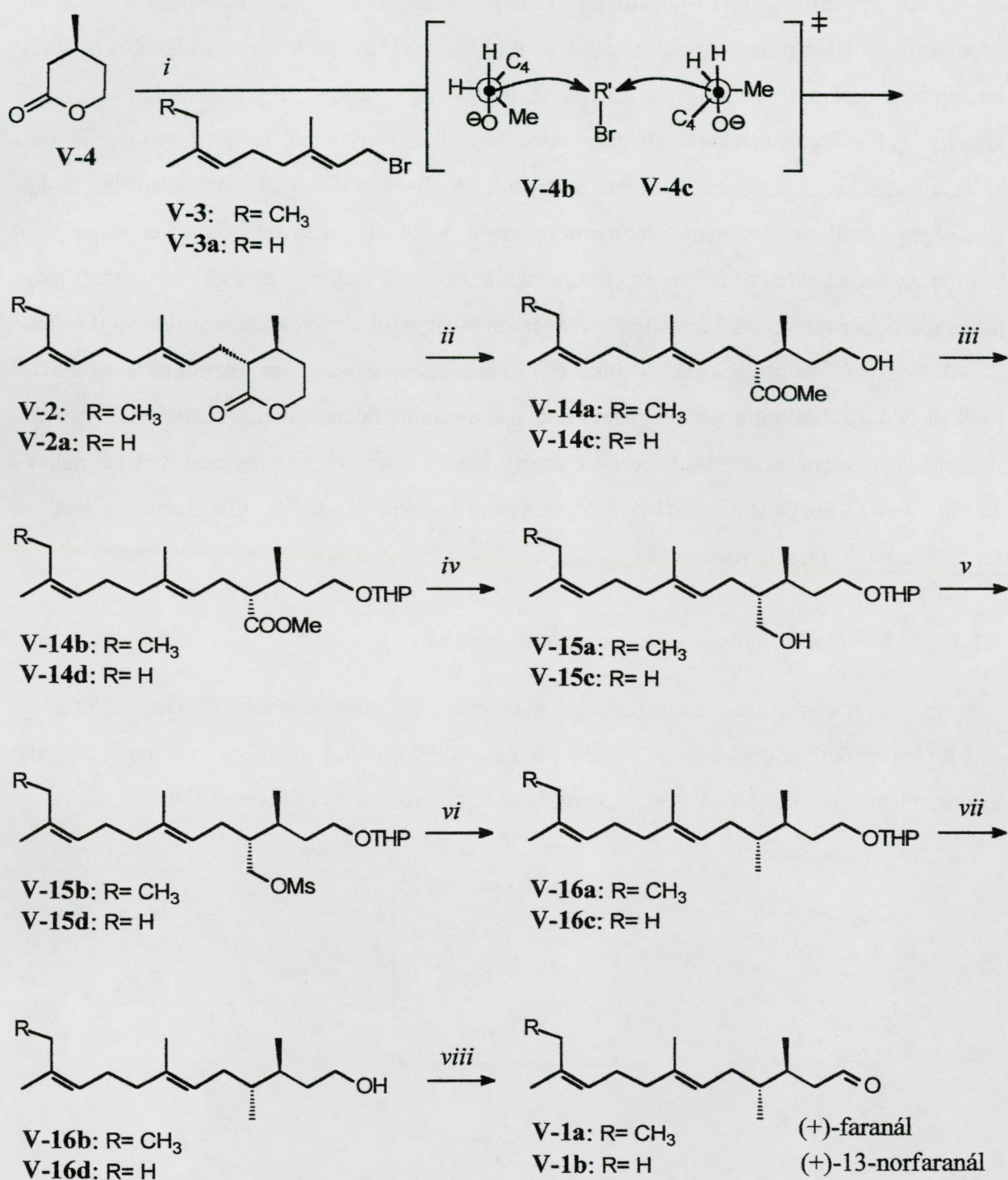
Reagensek: *i.)* PLE, víz, pH= 8; *ii.)* átkristályosítás L-cinkonidinnel vízből; *iii.)* LiOH, MeOH, 0 °C; *iv.)* LiBH₄, THF, Δ.

A prokirális diészter (**V-7**) enantiótóp szelektív hidrolízisével nyert optikailag aktív félésztert (**V-8**) lítium-[tetrahidrido-borát] segítségével redukálva az α-helyzetben történő alkilezésre alkalmas laktonhoz jutottunk (15. Ábra). A lakton alkilezéséhez gerániolból (**V-5**) a 16. ábrán feltüntetett úton (7*Z*)-homogeranil bromidot (**V-3**), ill. egy lépéses brómozással geranil bromidot (**V-3a**) állítottunk elő.



16. Ábra A (7*Z*)-homogeranil bromid (**V-3**) előállítása

Reagensek: *i.)* NaH, BzBr, THF, 50 °C; *ii.)* MCPBA, CH₂Cl₂, RT; *iii.)* (*i*-Pr)₃Al, toluol, Δ; *iv.)* *t*-BuOOH, kat. VO(acac)₂, benzol, RT; *v.)* Me₂CuLi, Et₂O, -20 - 0 °C; *vi.)* Me₂NCH(OMe)₂, RT; *vii.)* Ac₂O, Δ; *viii.)* Li, NH₃; *ix.)* PBr₃, Et₂O, -5 °C.



17. Ábra A (+)-faranál (V-1a) és a (+)-13-norfaranál (V-1b) előállítása

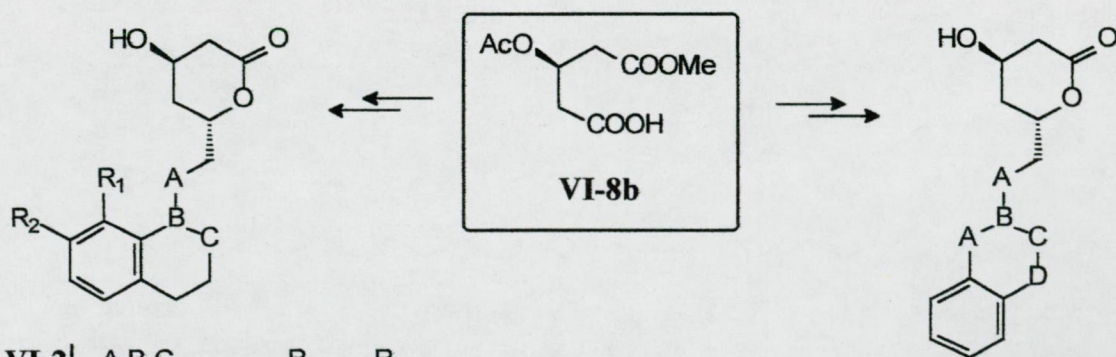
Reagensek: i.) LiNEt₂, THF, -78 °C, majd R'-Br, THF, HMPA, -78 -30 °C között; ii.) MeOH, Et₃N, RT; iii.) DHP, kat. PPTS, CH₂Cl₂, RT; iv.) LiAlH₄, Et₂O, RT; v.) MsCl, Et₃N, Et₂O, 0 °C - RT; vi.) LiAlH₄, THF, Δ; vii.) kat. TsOH, MeOH, RT; viii.) PDC, CH₂Cl₂, RT.

Az optikailag tiszta lakton (V-4) és a megfelelő bromidok (V-3 ill. V-3a) előállítása után a (+)-faranál (V-1a) ill. (+)-13-norfaranál (V-1b) szintézisének egyik kulcslépése a laktonból képezhető enolát diasztereoszelektív alkilezése (17. Ábra), melynek során kialakul a második aszimmetria-centrum. Az *anti*-diasztereoszelektivitás magyarázata, hogy a laktonból képezhető viszonylag kis konformációs szabadságfokkal rendelkező enolátból az alkil bromiddal való kölcsönhatás két lehetséges átmeneti állapoton (V-4b ill. V-4c) át játszódhat le. A két lehetséges közül az *anti* diasztereomerhez vezető V-4c út a kedvezőbb, mivel itt az alkil bromid az enolát rendszert merőlegesen, a metilcsoporttal átellenes oldalról közelítheti meg; míg a másik diasztereomer képződéséhez a térben jóval gátoltabb V-4b átmeneti állapot vezet.

A kedvező diasztereoszelektivitású (94:6) alkilezési lépéssel az alkilezett laktonokban (V-2 ill. V-2a) kialakult a két megfelelő térállású aszimmetriacentrummal rendelkező szénváz. A szintézis további részében a funkciós csoportoknak a kívánt célvegyületeket [(+)-faranál, V-1a ill. (+)-13-norfaranál, V-1b] eredményező átalakítását kellett elvégezni, melyet jó termeléssel tudtunk megvalósítani.

2.2.1.2. A mevinolin naftalin analogonjainak szintézise

Az észteráz-katalizált hidrolízissel előállított (3*R*)-hidrogén-metil 3-acetoxiglutarátot (VI-8b) a vérkoleszterin szintet csökkentő hatású HMG-CoA inhibitor mevinolin naftalin analogonjainak (VI-2a-f ill. VI-3a,b) szintézisében használtuk fel (VI. melléklet ²¹).

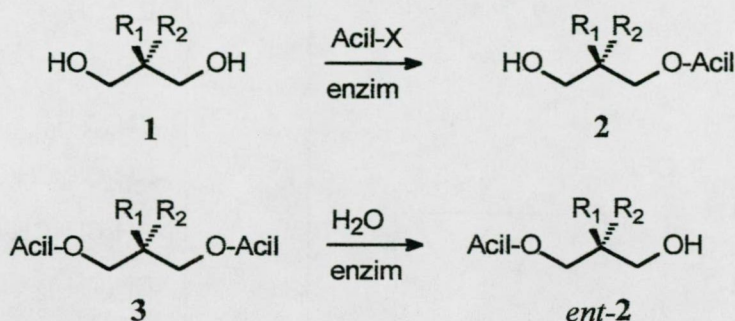


VI-2	A-B-C	R ₁	R ₂
a	CH=C-CH ₂ (E)	H	H
b	CH ₂ -CH-CH ₂	H	H
c	CH ₂ -C=CH	H	H
d	CH ₂ -CH-CH ₂	OMe	H
e	CH ₂ -CH-CH ₂	H	OMe
f	CH ₂ -CH-CH ₂	H	Ph

VI-2	A-B-C-D
a	CH=C-CH ₂ -CH ₂
b	CH=CH-CH=CH

2.2.2. Prokirális 1,3-diolszármazékok enantiotóp szelektív reakciói

A különféle prokirális 1,3-diolszármazékok (1 ill. 3) enantiotóp szelektív átalakítása a biokatalízis alkalmazási területének régóta tanulmányozott tárgya ^{2,3}.



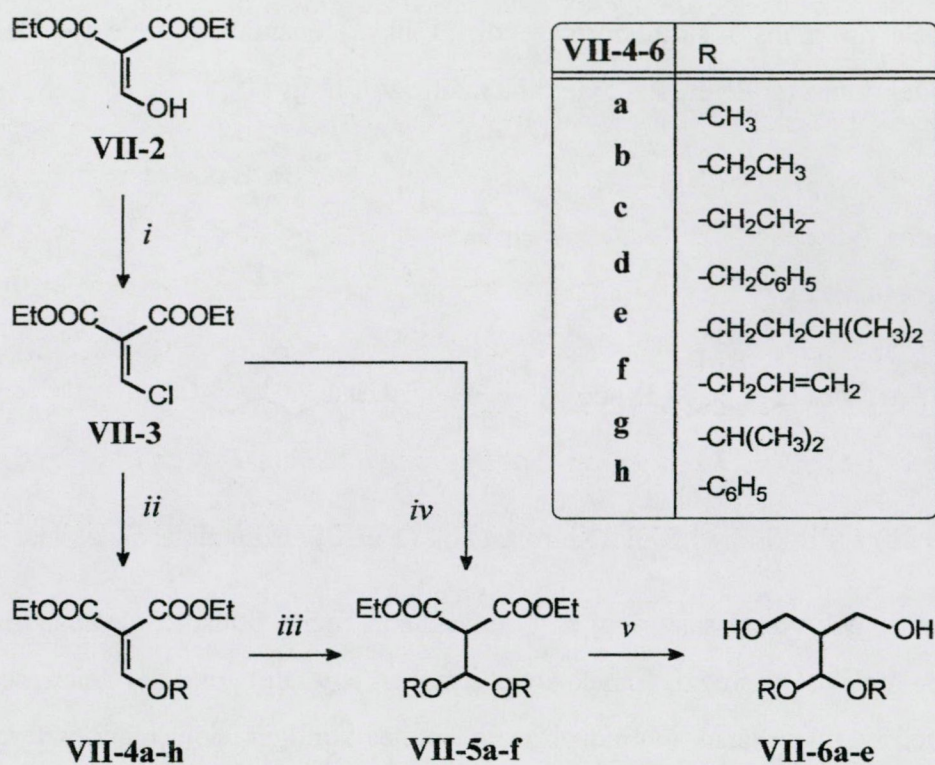
18. ábra Prokirális 1,3-diol származékok (1 ill. 3) enzimatisz átalakítása

A folyamat egyik vonzó sajátsága, hogy ugyanazon enzim általában ugyanazon prokirális oldat szelektív átalakítását végzi. Ennek következtében egy adott diol (1) acilezése és a diol megfelelő diacil származékának (3) hidrolízise ellentétes konfigurációjú monoésztereket (2 ill. *ent*-2) szolgáltat.

2.2.2.1 Védett aldehid funkciót tartalmazó prokirális 1,3-dioloz enzimkatalizált acilezése

Az optikailag aktív C₃ egységek közül érdekesnek tartottuk megvizsgálni a 2-helyzetben védett aldehid funkciót tartalmazó prokirális 1,3-dioloz enzimatisz acilezését, miután e reakcióban nyerhető királis vegyületek három, eltérő kémiai sajátsággal rendelkező, változatos módon továbbalakítható oldallánccal bírnak. Ilyen vegyületek korábban nem voltak ismertek, ezért módszert dolgoztunk ki a védett aldehid funkciót tartalmazó prokirális 1,3-dioloz (VII-6a-e) előállítására (19. Ábra, VII. melléklet ³⁸).

Eljárásunk alapját a következő kémiai előzmények szolgáltatták. A dietil etoximetilénmalonát (VII-4b) etanolban nátrium etilát ^{39,40} vagy fém nátrium ⁴¹ segítségével dietil (dietoxi)metilmalonáttá (VII-5b) alakítható, illetve belőle metanolban végzett bázis-katalizált reakcióban a megfelelő dimetil (dimetoxi)metilmalonát képződik ⁴². A dietil klórmetilénmalonát (VII-3) ⁴³ piridin jelenlétében alkohollal a megfelelő dietil alkoximetilénmalonátot ⁴⁴ szolgáltatta. Mivel a dietil klórmetilénmalonát (VII-3) előállítását egy jelentősen megjavított módszerrel megoldottuk, ez utóbbi reakció jól általánosítható alapul szolgált a kívánt prokirális malonátok, majd ezek redukciójával a dioloz (VII-6) előállításához.



VII-4-6	ii.) Reakció VII-4, T. [%]	iii.) Reakció VII-5, T. [%]	iv.) Reakció VII-5, T. [%]	v.) Reakció VII-6, T. [%]
a	95	87	92	86
b	96	90	93	92
c	-	-	94	37
d	95	80	80	82
e	95	86	89	74
f	94	85	77	bomlás
g	95	nem reagál	nem reagál	-
h	91	nem reagál	nem reagál	-

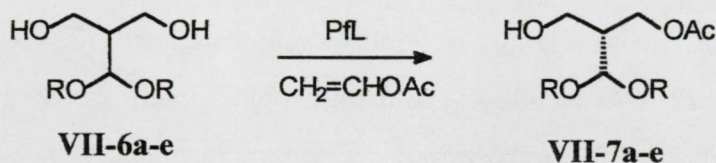
19. Ábra Védett aldehid funkciót tartalmazó prokirális 1,3-diolok (**VII-6a-e**) előállítása
Reagensek: i.) SOCl₂, DMF; ii.) ROH, piridin; iii.) ROH, kat. Na; iv.) ROH, 1.3 ekv. NaH;
v.) LiAlH₄.

A dietil alkoximetilénmalonátokat (**VII-4a-h**) eredményező reakció (19. Ábra, ii. lépés) jól általánosíthatónak bizonyult. Az ezt követő bázis-katalizált alkoxid addíció (19. Ábra, iii. lépés) a kívánt acetálokat (**VII-5a,b,d-h**) szolgáltatatta, bár e lépésben nagy térigényű (pl. *i*-propoxid-, *t*-butoxid- ill. fenoxid-) alkoholátok addíciója nem volt megvalósítható. Sztöchiometrikusnál valamivel nagyobb mennyiségű bázis alkalmazásával a

dietil (dialkoxi)metilmalonátok (VII-5a-f) előállítása egy lépésben (19. Ábra, iv. lépés) is megoldható volt. A megfelelő diészterek (VII-5a-f) redukciója (19. Ábra, v. lépés) a diallil acetál (VII-5f) kivételével a várt módon játszódott le.

A megfelelő prokirális diolok (VII-6a-e) előállítása után a vegyületek enzimatis acilezési reakciók előkísérleteit a dietil acetál (VII-6b) vegyületen végezve megállapítottuk, hogy az enantiotóp szelektivitás mértéke *Pseudomonas fluorescens* lipáz (Pfl) enzimmel (vinil acetát, hexán - dietiléter 1:1) a legnagyobb. Az így képződő monoacetát (VII-7b) esetében elvégeztük az abszolút konfiguráció meghatározását is, ismert konfigurációjú vegyülethez vezető kémiai korreláció segítségével. Ennek megfelelően a további származékokat is ezzel az enzimmel, acilezőszerrel és oldószerösszetétellel vizsgáltuk ³⁸. A további termékek abszolút konfigurációját a forgatások egyező előjele és a soron belüli analógia alapján feltételeztük

9. Táblázat Védett aldehid funkciót tartalmazó prokirális 1,3-diolok (VII-6a-e) enzimatis acilezése



	R	Idő (óra)	Term. (%)	[α] _D	E.t. (%)
a	metil-	12	46	+4.1	44
b	etil-	10	85	+4.9	71
c	1,2-etenil-	7	38	+0.3	~0
d	benzil-	21	92	+7.4	70
e	i-amil-	24	70	+3.7	68

Az enantiotóp szelektivitás mértéke az acetál minőségével befolyásolhatónak bizonyult. A kisebb térigényű acetálokkal (VII-6a,c) gyengébb, míg a nagyobbakkal (VII-6b,d,e) elfogadható mértékű enantiotóp szelektivitást tapasztaltunk. Szintetikus szempontból a VII-6d diolból nyert optikailag aktív monoacetát (VII-6d) a legígéretesebb, mivel e vegyület dibenzil acetálként maszkírozott aldehid funkciója mind savas hidrolízissel, mind katalitikus hidrogénezéssel felszabadítható.

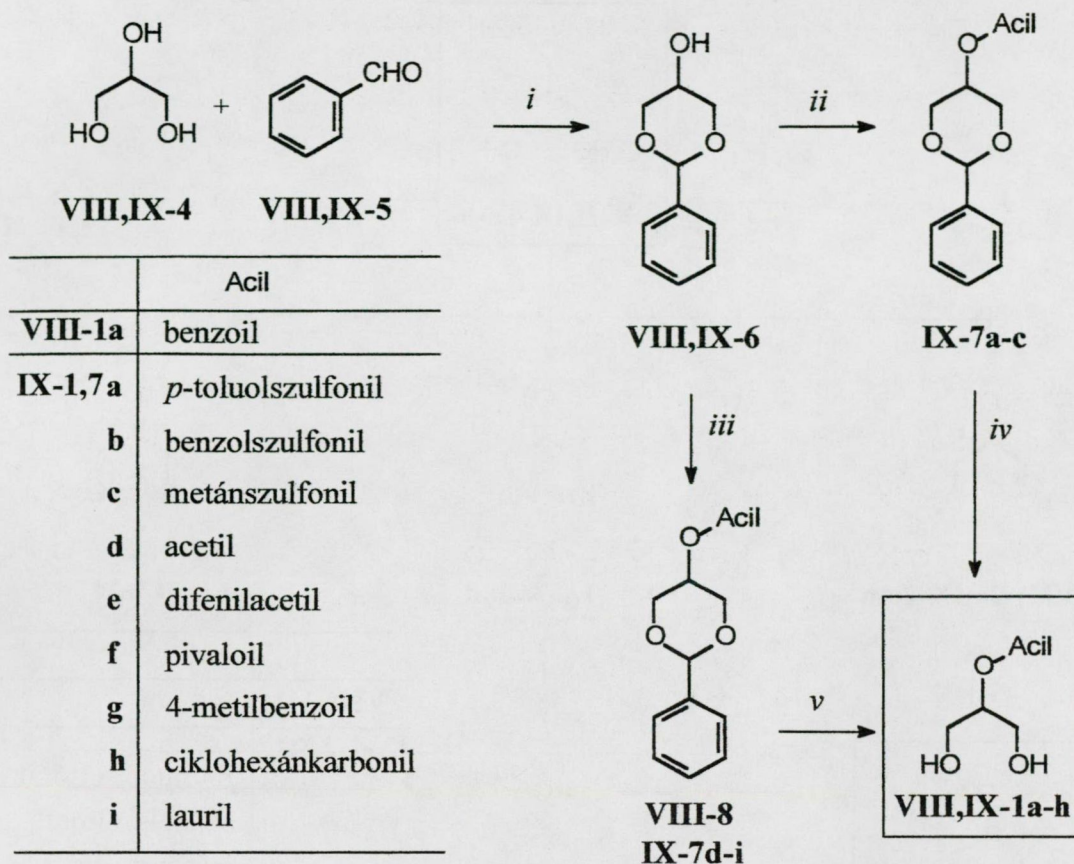
2.2.2.2. Prokirális 2-aciloxi-1,3-diolok enzimkatalizált acilezése ⁴⁵⁻⁴⁸

A glicerín királis származékai fontos C₃ kulcsintermedierek számos biológiailag aktív vegyület, mint pl. foszfolipidek ⁴⁹, foszfolipáz A₂ inhibitorok ⁵⁰, PAF ⁵¹ (platelet-activating factor) és más anyagok ⁵² szintéziseiben.

2-*O*-Alkil-glicerín származékok (18. Ábra, 1, R₁,R₂= *O*-alkil, H), mint pl. a 2-*O*-metil-^{53,54}, 2-*O*-etil-^{53,54}, vagy a 2-*O*-benzil-glicerín ⁵³⁻⁵⁶ enzimkatalizált acilezése optikailag aktív monoacetátokat (2) eredményezett. A megfelelő diacil vegyület (3, R₁,R₂= OBn, H) enzimkatalizált hidrolízisét különböző körülmények között ugyancsak többen tanulmányozták ⁵⁶⁻⁶⁰. A 2-*O*-alkil-glicerín származékok lipáz-katalizált átalakításai során a folyamat *pro-S* szelektivitásának bizonyult. A hidrolitikus folyamatok kiküszöbölhetetlen hátránya az optikailag aktív (*S*)-1-*O*-acetyl-2-*O*-benzil-glicerín (2, R₁= H, R₂= OBn) esetében még pH= 7 foszfátpufferben is tapasztalható lassú racemizáció (~ 2 %/óra) ⁵⁶.

Bár a fentiek szerint a 2-*O*-alkil-glicerín származékok (18. Ábra, 1 ill. 3, R₁,R₂= *O*-alkil, H) enantiotóp szelektív biotranszformációit többen tanulmányozták, nem találtunk egyetlen példát sem a 2-*O*-acil-glicerín származékok (1, R₁,R₂= *O*-acil, H) enzimatis átalakítására. E tekintetben említésre méltó, hogy e királis vegyületcsalád (2, R₁,R₂= *O*-acil, H) két tagját, úgymint az 1-*O*-acetyl-2-*O*-(16-metil)heptadekanoil- és az 1-*O*-acetyl-2-*O*-(18-metil)nonadekanoil-glicerint a természetből (*Nicotina benthamiana*) is izolálták ⁶¹. Ez készített bennünket e szintetikus célokra is felhasználható vegyületcsalád vizsgálatára (VIII. ⁴⁵ ill. IX. ⁴⁷ mellékletek).

A diolokat (VIII-1a, IX-1a-h) egyszerű úton nyertük (20. Ábra). A glicerín (VIII-4) és benzaldehyd (VIII-5) kondenzációjával ⁶² kristályos formában nyerhető *cisz*-2-fenil-5-hidroxi-1,3-dioxán (VIII-6) acilezésével acilezett benzilidén származékokat (VIII-8, IX-7a-h), majd ezekből a benzilidén csoport eltávolításával prokirális diolokat (VIII-1a, IX-1a-h) állítottunk elő. Az acilezés/védőcsoport eltávolítás kissé eltérő volt a vizsgált két acilcsoport-típusnál. A szulfonsav észterek (IX-7a-c -> IX-1a-c) esetében az acilezéshez acil kloridot és porított kálium-hidroxidot éterben, a védőcsoport eltávolításához savas hidrolízist (cc. HCl, MeOH, reflux); míg a karbonsav észterek (VIII-8, IX-7d-i -> VIII-1a, IX-1d-h) esetében az acilezéshez acil kloridot és piridint diklórmétánban, a védőcsoport eltávolításához pedig izopropanolban 10 % Pd/C segítségével végzett katalitikus hidrogénezést használtunk.

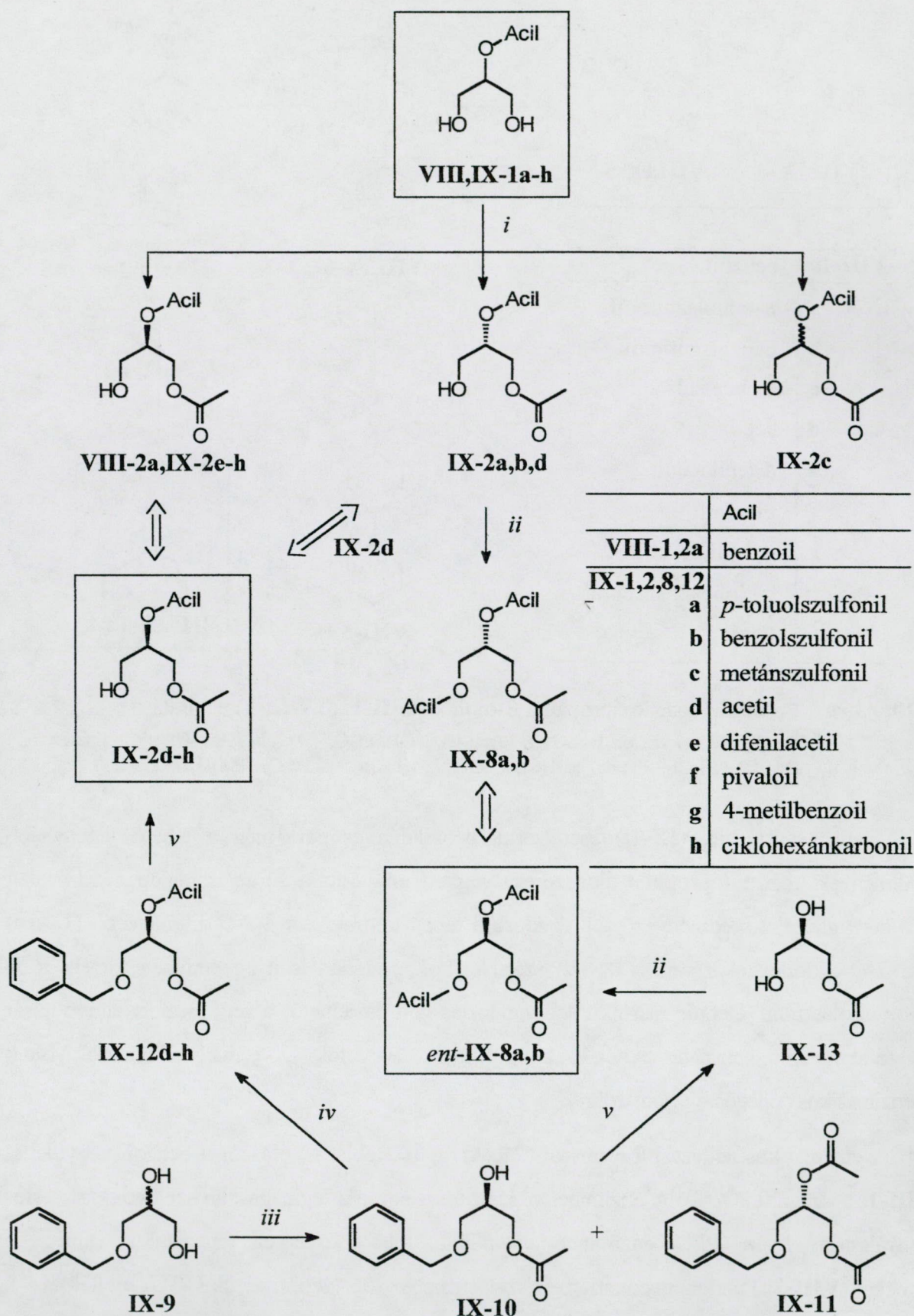


20. Ábra Prokirális 2-aciloxipropán-1,3-diolk (VIII-1a, IX-1a-h) előállítása

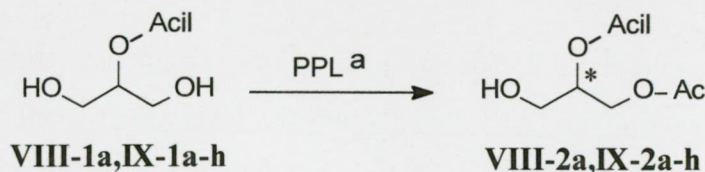
Reagensek: *i.*) kat. cc. H₂ SO₄; *ii.*) Acil-Cl, KOH, Et₂O, -5 °C; *iii.*) Acil-Cl, piridin, kat. DMAP, CH₂Cl₂, RT; *iv.*) cc. HCl, MeOH, Δ; *v.*) H₂, 10 % Pd/C, *i*-PrOH.

A lauril származék (IX-7i) esetében a benzilidén csoport még a lehető legenyhébb körülmények között (aprotikus oldószerek) végzett eltávolítása során is majdnem kizárólag 1-*O*-lauril-glicerint eredményező acil-vándorlást tapasztaltunk. Bár a 2-*O*-difenilacetil- (IX-1e) és a 2-*O*-ciklohexánkarbonil- (IX-1h) származékok esetében is üvegedényben történt több napos tárolás után jelentős mértékű acil-vándorlás volt észlelhető, a védőcsoport eltávolítását követő azonnali felhasználás esetén ezek a prokirális 1,3-diolk (IX-1e,h) is alkalmasak voltak az enzimatis acilezési vizsgálatokra.

Az enzimatis acilezési folyamatot (21. Ábra, 10. táblázat) először a benzoil vegyülettel (VIII-1a) vizsgáltuk⁴⁵. Több enzimmel végzett teszt során a legmagasabb szelektivitást sertés hasnyálmirigy lipáz (PPL) enzimmel hexán-THF 1:1 oldószerben tapasztaltuk, amivel a terméket (VIII-2a) majdnem enantiomertiszta formában (96 %ee) nyertük (VIII. melléklet⁴⁵). A kezdeti eredmények kiterjesztéseként további 2-aciloxipropán-1,3-diolk (IX-1a-h) PPL-katalizált reakcióit is tanulmányoztuk (IX. melléklet,⁴⁶⁻⁴⁸).



10. Táblázat 2-Aciloxipropán-1,3-diolok (VIII-1a, IX-1a-h) enzimatis acilezése



	<i>Idő</i> [óra]	<i>Termelés</i> [%]	<i>E.t.</i> ^b [%]	<i>Konfiguráció</i>	$[\alpha]_D$ (c 1, metanol)
VIII-2a	1	63	96	<i>R</i>	-27.4
IX-2a	168	74	31	<i>S</i>	+9.2
IX-2b	3	71	31	<i>S</i>	+6.2
IX-2c	11	67	0	-	0.0
IX-2d	6	79	40	<i>S</i>	+1.8
IX-2e	48	80	16	<i>R</i>	-2.3
IX-2f	6	82	67	<i>R</i>	-8.0
IX-2g	11	77	≥98	<i>R</i>	-27.5
IX-2h	5	66	> 95 ^c	<i>R</i>	- 8.7

^a *Reakciókörülmények*: 0.25 g szubsztrát (**VIII-1a, IX-1a-h**), 200 mg PPL, 0.8 ml vinil acetát, 2.5 ml THF, 2.5 ml hexán, keverés, RT; ^b A **IX-2a-g** MTPA észterek ¹H-NMR spektrumából. ^c A termék optikai forgatásának ismert enantiomer tisztaságú **IX-12h** vegyületből előállított **IX-2h** forgatásával történő összevetéséből.

A korábban nem ismert 2-aciloxipropán-1,3-diolok (**VIII-1a, IX-1a-h**) ugyancsak új acilszármazékainak (**VIII-2a, IX-2a-h**) meg kellett határozni az abszolút konfigurációját is. Ezt a 21. Ábrán látható módon, a 3-benziloxipropán-1,3-diol (**IX-9**) enzimatis acilezésével előállított, ismert abszolút konfigurációjú termékekkel (**IX-10** ill. **IX-11**) történő kémiai korreláció segítségével oldottuk meg.

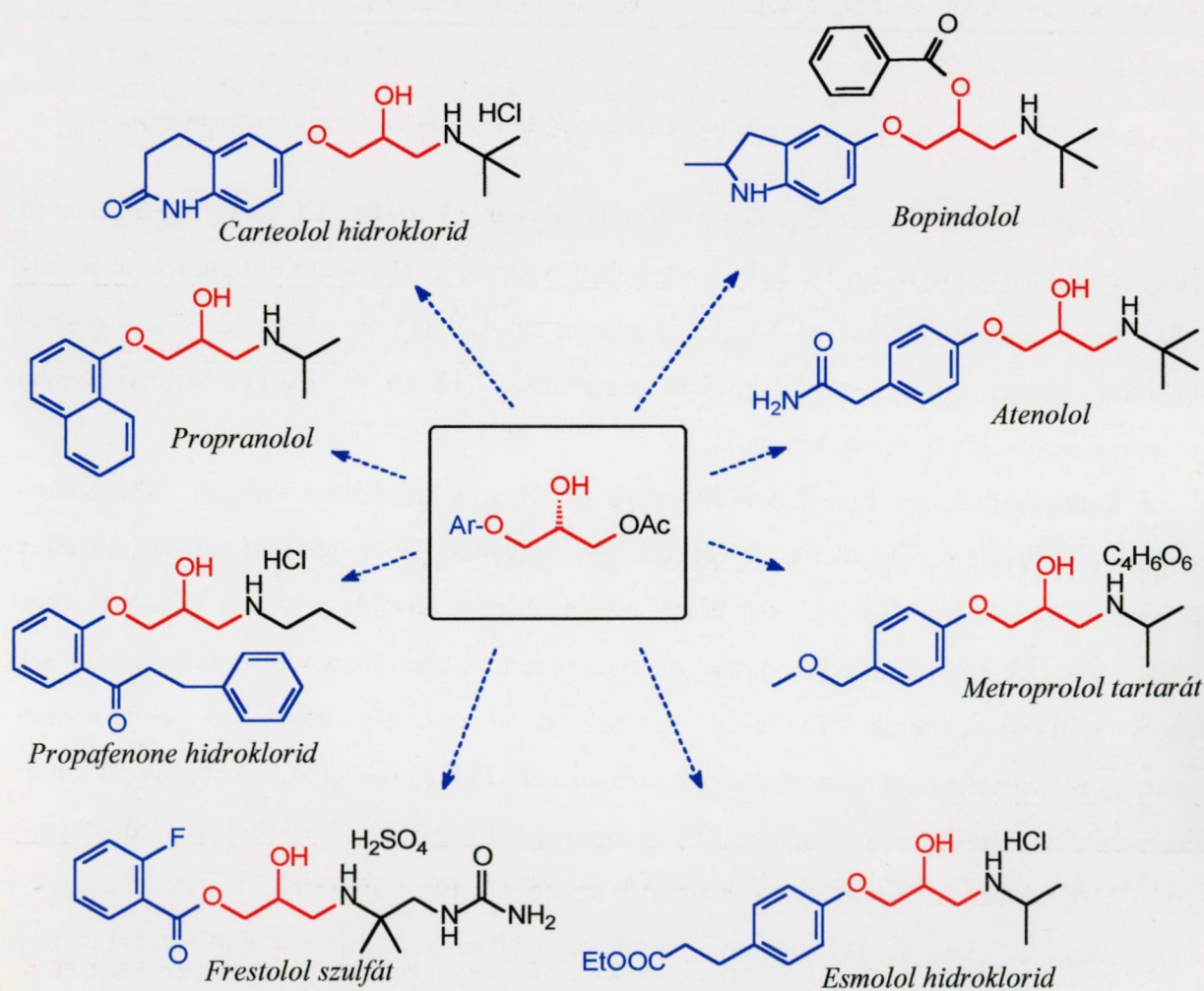
A karbonsav észter típusú acilcsoportok esetében a kezdetben vizsgált 2-benzoiloxi csoportot tartalmazó vegyülethez (**VIII-2a**: 96 %ee) képest a térigény enyhe növelése szelektivitásnövekedést (**IX-2g**: >98 %ee), míg a térigény további növelése (**IX-2e,f**) vagy csökkentése (**IX-2d**) szelektivásromlást eredményezett. A szintetikus szempontból ugyancsak fontos szulfonsavészterek (**IX-2a-c**) esetében a szelektivás inverzióját és romlását tapasztaltuk. Mivel a tozil csoportot tartalmazó termék (**IX-2a**) szintetikus szempontból fontos lehet, ezért a folyamatot a korábban PPL enzimmel legmagasabb szelektivitást eredményező hexán-THF oldószerkeletben több enzimmel ugyancsak megvizsgáltuk^{46,47}. A legnagyobb szelektivitást a Lipozym IM enzimmel érték el, mellyel kismértékben nőtt az enantiotóp szelektivás mértéke (**IX-2a**, 42 %ee).

2.2.3. Prokirális ketonok enantiotóp szelektív redukciója sűtőélesztővel

A korábban tárgyaltak [1.1.3.2. fejezet, 3. a.) Ábra] értelmében trigonális centrumok prokirális oldalainak enantiotóp szelektív megkülönböztetésével zajló biokatalitikus folyamatok kedvező lehetőséget nyújtanak akirális kiindulási anyagok jó termeléssel királis termékeké történő átalakítására. Ilyen szelektivitás megnyilvánulása várható aszimmetrikusan szubsztituált ketonok enzimatis redukciójakor, ami pl. sűtőélesztő segítségével igen kedvezően oldható meg³.

2.2.3.1. 1-Acetoxi-3-ariloxipropán-2-onok enantiotóp szelektív redukciója

A megfelelő ketonok enantiotóp szelektív redukciójával nyerhető 1-acetoxi-3-ariloxipropán-2-olok szerkezete számos β -blokkoló alapvázában felismerhető (22. ábra)



22. ábra 1-Acetoxi-3-ariloxipropán-2-olok és β -blokkolók szerkezeti hasonlósága

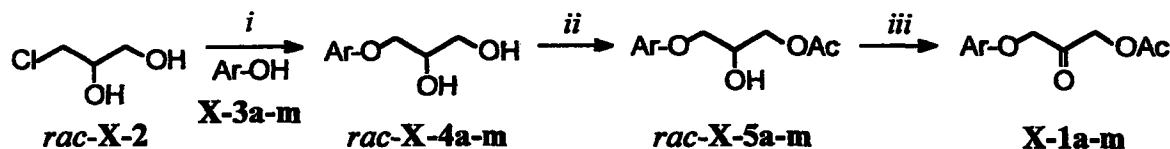
Racém 3-ariloxipropán-1,2-diol származékok biokatalitikus rezolválása megoldható lipáz-katalizált enantiomer szelektív acilezés segítségével^{63,64}.

Bár sütőélesztővel megoldható volt olyan acetoximetil ketonok enantiotóp szelektív redukciója, melyek a karbonilcsoport másik szubsztituenseként fenil-⁶⁵, benziloximetil-⁶⁶, vagy azidometil-⁶⁷ csoportokat tartalmaztak, ám 3-ariloxi-1-acetoxipropán-2-onok redukciójára nem találtunk utalást.

Mivel az 1-acetoxi-3-ariloxipropán-2-olok várhatóan előállíthatók 1-acetoxi-3-ariloxipropán-2-onok (X-1a-m) sütőélesztővel végezhető enantiotóp szelektív redukció segítségével, szintetikus módszert dolgoztunk ki ezen ketonok előállítására (11. Táblázat, X. melléklet⁶⁸).

ket-
fel-
melyik
a helyen?

11. Táblázat 1-Acetoxi-3-ariloxipropán-2-onok (X-1a-m) előállítása



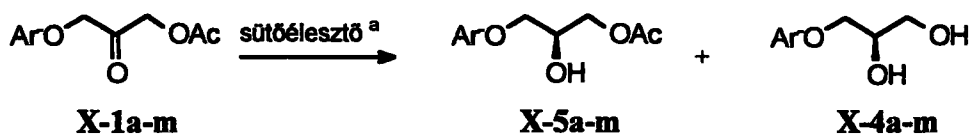
Ar	rac-4a-m Termelés (%)	rac-5a-m Termelés (%)	1a-m Termelés (%)
a fenil	81	79	94
b 1-naftil	82	78	93
c 2-naftil	79	75	90
d 2-izopropilfenil	77	83	91
e 2-klórfenil	74	73	88
f 3-klórfenil	55	69	94
g 4-klórfenil	81	62	94
h 2-metilfenil	79	66	90
i 3-metilfenil	66	75	90
j 4-metilfenil	71	75	89
k 3-nitrofenil	26	68	87
l 2,6-dimetilfenil	98	43	79
m 2,4,6-triklórfenil	99	42	71

Reagensok: i.) NaOH, etanol; ii) Ac₂O, DMAP, piridin; iii.) oxalil-klorid, DMSO, Et₃N.

A fenil vegyülettel (X-1a) optimalizáltuk a sütőélesztővel megvalósítható enantiotóp szelektív redukció reakciókörülményeit (X. melléklet), majd ezen körülmények között tanulmányoztuk a további prokirális ketonok (X-1b-m) redukcióit is (12. Táblázat).



13. Táblázat 1-Acetoxi-3-ariloxipropán-2-onok (X-1a-m) redukciója sütőélesztővel

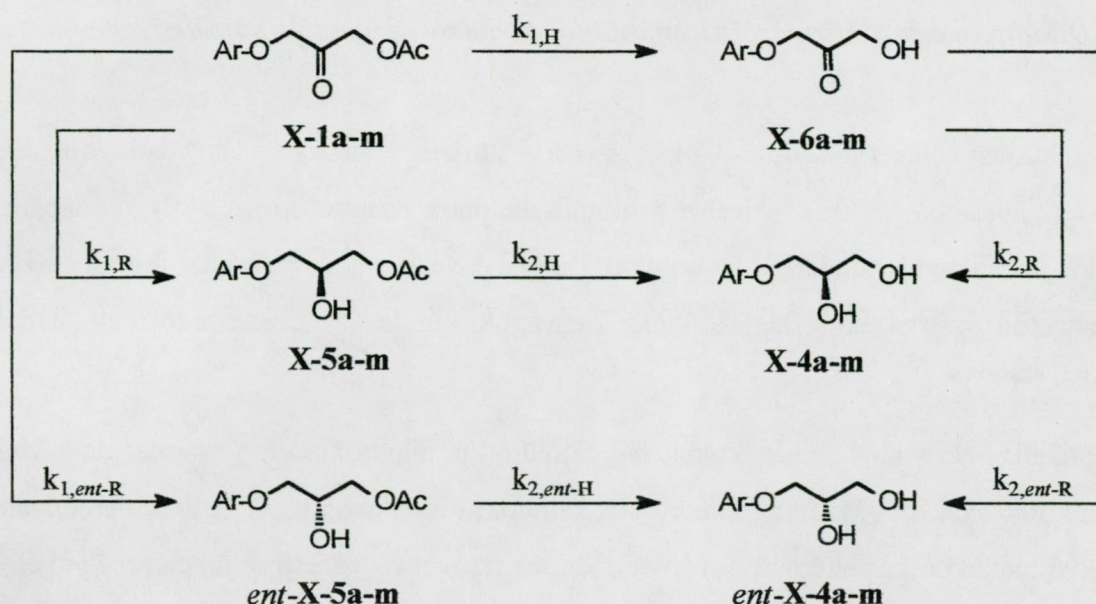


	Szusztrát X-1a-m	Idő (óra)	X-5a-m ^b		X-4a-m	
			T. (%)	E.t. (%)	T. (%)	E.t. (%)
a	fenil	1	84	83 ^c	-	
b	1-naftil	2	-		78	>95 ^d
c	2-naftil	16	-		-	
d	2-izopropilfenil	1	36	28 [*]	55	93 ^e
e	2-klórfenil	2	-		82	>95 ^e
f	3-klórfenil	2	38	93	48	81 ^e
g	4-klórfenil	2	65	61	25	63 ^e
h	2-metilfenil	2	32	65	47	>95 ^e
i	3-metilfenil	2	66	77	26	82 ^e
j	4-metilfenil	2	36	52	40	68 ^e
k	3-nitrofenil	4	-		80	>95 ^d
l	2,6-dimetilfenil	1.5	60	>95	32	>95 ^d
m	2,4,6-triklórfenil	6	58	95	34	92 ^d

^a Reakciókörülmények: 500 mg X-1a-m; 200 ml kálium foszfát puffer (0.15 M, pH 7); 12 g sütőélesztő; 5 g cukor. ^b A monoacetátok (X-5a-m) konfigurációját és enantiomer tisztaságát a megfelelő diolok (X-4a-m) forgatóképességéből határoztuk meg; ^c Az X-5a MTPA észterének ¹H-NMR spektrumából; ^d A megfelelő fenol (X-3) és az (R)-3-klórpropán-1,2-diol [(R)-X-2, E.t.= 95 %]¹³ reakciójával nyert diol [(R)-4] forgatóképességéből; ^e A diol di-MTPA észterének ¹H-NMR spektrumából. ^{*} A termék az ábrázoltal ellentétes, (R)-konfigurációjú

A folyamatban a redukció mellett változó mértékű hidrolízist is észleltünk, melynek következtében ugyancsak optikailag aktív diolokat (X-4) is kaptunk. A reakcióban változó mennyiségű és enantiomer tisztaságú monoacetátok mellett (X-5) 90% feletti enantiomer tisztaságú diolok (X-4) képződését jellemzően a nagy térkitöltésű aril szubsztituenseket tartalmazó ketonok (X-1b,d,e,h,k-m) redukciója esetében tapasztaltuk.

Az eredmények értelmezésében a redukció / hidrolízis reakciók lefutásának részletesebb elemzése segíthet (23. Ábra). A monoacetátok eredeti enantiomerösszetétele (X-5 vs. *ent*-X-5) a redukció enantiotóp szelektivitásától függ ($k_{1,R}$ vs. $k_{1,ent-R}$). A diol frakció (4 ill. *ent*-4) két alternatív úton képződhet: 1.) a monoacetát frakció (X-5 ill. *ent*-X-5) hidrolízisével, ekkor annak eredeti enantiomerösszetétele a hidrolízis enantiomer szelektivitásától ($k_{2,H}$ vs. $k_{2,ent-H}$) függően változhat; 2.) az akirális keton (X-1) nem-sztereoszzelektív hidrolízisét ($k_{1,H}$) követően, a képződő hidroximetil keton (X-6) enantiotóp szelektív redukciójával ($k_{2,R}$ vs. $k_{2,ent-R}$).



23. Ábra Az 1-acetoxi-3-ariloxipropán-2-onok (**X-1a-m**) redukció / hidrolízis reakcióinak elemzése

Az 1-acetoxi-3-ariloxipropán-2-onok (**X-1a-m**) fermentáló sütőélesztő segítségével, pufferelt oldatban (pH= 7) végrehajtott redukciója (13. Táblázat) a 2-izopropilfenoxi vegyület (**X-1d**) reakciójának - ahol (*R*)-monoacetát (**X-5d**) képződött - kivételével (*S*)-monoacetátokat (**5a,f,j,l,m**) és / vagy (*R*)-diolokat (**4b,d-m**) eredményezett. Ez geometriai értelemben véve mindkét termék esetében azonos enantiotóp preferenciát jelent.

Ezek az eredmények a legjobban úgy értelmezhetők, ha elsőként az acetoximetil ketonok (**X-1**) gyors, változó mértékű (*S*)-enantiomer preferenciával ($k_{1,R} > k_{1,ent-R}$) lejátszódó redukcióját feltételezzük, amit az (*R*)-diolok (**X-4**) képződésének irányában enyhén enantiomer szelektív hidrolízis ($k_{2,H} > k_{2,ent-H}$) követ. Ezzel magyarázható a 2-izopropilfenoxi vegyület (**X-1d**) reakciójában az alacsony enantiomer tisztaságú (*R*)-monoacetát (**ent-5d**) képződése anélkül, hogy feltételezni kellene az egy vegyületcsaládon (**X-1**) belül kevésbé valószínű enantiotóp-preferencia változást. Ebben az esetben tehát a reakció feltehetően az acetoximetil keton (**X-1d**) mérsékelt (*S*)-enantiotóp szelektivitással lejátszódó redukciójával zajlik, amit az (*S*)-monoacetátból (**X-5d**) képződő (*R*)-diol (**X-4d**) képződését preferáló, viszonylag magas enantiomer szelektivitással zajló enzimatis hidrolízis követ. Ennek eredményeként a hidrolizálatlanul visszamaradó monoacetát frakcióban az (*R*)-monoacetát (**ent-5d**) dúsul fel.

2.2.3.2. Dihidroxiaceton származékok enantiotóp szelektív redukciója sűrűléstővel

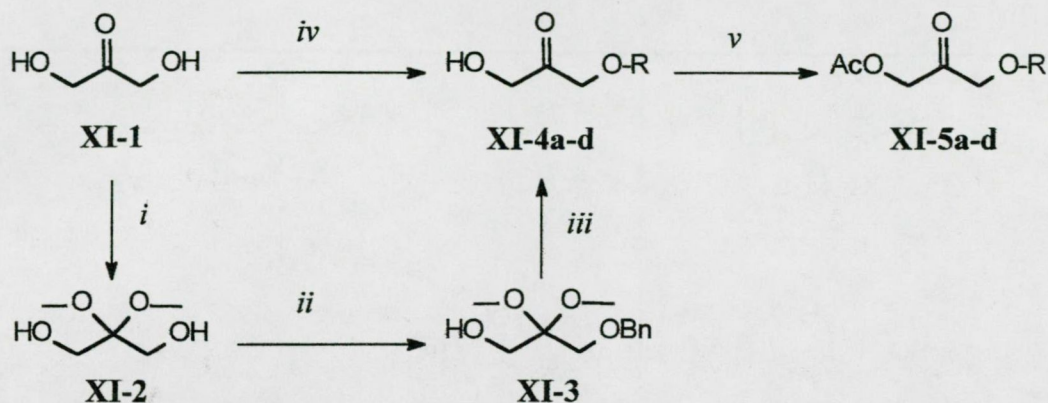
A királis glicerín-származékok széles körben hasznos anyagok lehetnek (ld. 2.2.3.1. fejezet, 22. ábra). Mivel a prokirális ketonok enantiotóp szelektív redukciója a megfelelő királis szekunder alkoholokat eredményezi, az aszimmetrikusan védett dihidroxiaceton származékok ideális kiindulóanyagok királis C₃ származékok előállítására (XI. melléklet ⁶⁹).

Optikailag aktív C₃ származékokat már előállítottak dihidroxiaceton származékok királis ruténium komplexekkel végzett aszimmetrikus katalitikus redukciójával ⁷⁰⁻⁷². E kémiai folyamat kézenfekvő biokatalitikus alternatívája lehet a sűrűléstővel végezhető redukció, melyet egyes vegyületek [3-metoxi- ⁷³, 3-benzoiloxi- and 3-(4-nitrobenzoil)oxi- ⁶⁶ 1-hidroxi-aceton származékok, ill. 3-benzoiloxi- ⁶⁶ vagy 3-ariloxi- ⁶⁸ 1-acetoxi-aceton származékok] esetében már vizsgáltak.

Különböző hidroximetil ketonok ill. acetátjuk sűrűléstővel végzett redukciója ⁷⁴⁻⁷⁶ azt mutatta, hogy a viszonylag kicsi, hidrofil hidroximetil csoportot tartalmazó ketonok geometriai értelemben véve azonos, míg a viszonylag nagyobb, apoláris acetoximetil ketonok ellentétes enantiotóp szelektivitással reagálnak. A sűrűléstővel végzett redukció enantiomerpreferenciájának ilyen értelmű inverzióját megfigyelhetjük fenacil alkoholok és acetátjaik redukciójakor ^{77,78}.

Mivel az aszimmetrikusan védett dihidroxiaceton származékok királis C₃ egységek prekurzorai, ám a fentieknek megfelelő enantiotóp preferencia inverziót hidroximetil csoportot ill. acetoximetil csoportot tartalmazó származékok körében szisztematikusan még nem vizsgálták, érdemesnek véltük e vegyületcsalád sűrűléstővel történő redukciójának behatóbb tanulmányozását.

Dihidroxi-acetonból (XI-1) kiindulva különböző védőcsoportokkal történő védelem után egyszerűen nyerhetőek hidroximetil keton (XI-4a-d) és acetoximetil keton (XI-5a-d) jellegű vegyületek (24. Ábra).



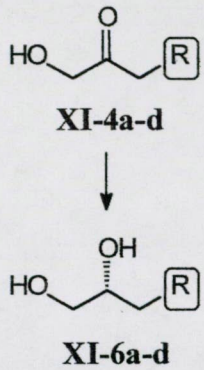
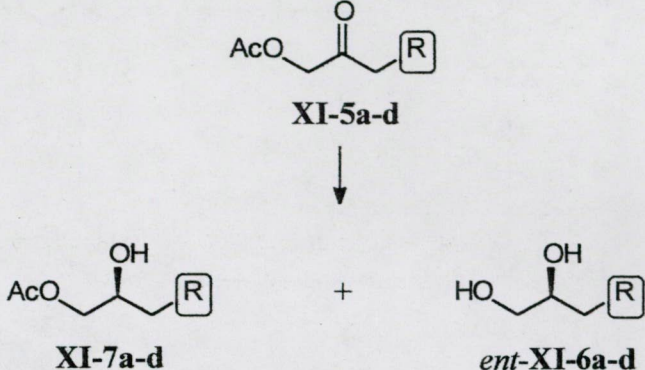
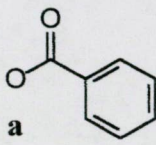
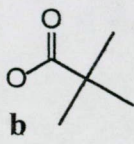
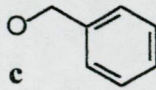
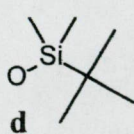
R	a	b	c	d

24. Ábra Védett dihidroxiaceton származékok (XI-4a-d) és acetátjaik (5a-d) előállítása

Reagensek: i.) Trimetil ortoformát, MeOH; ii.) BnBr, NaH, THF; iii.) 3 M HCl; iv.) BzCl, kat. DMAP, piridin (XI-4a), PivCl, kat. DMAP, piridin (XI-4b) ill. TBDMSCl, imidazole, THF (XI-4d); v.) Ac₂O, kat. DMAP, Et₃N, etil acetát (XI-5a,c,d) ill. AcCl, kat. DMAP, Et₃N, THF (XI-5b).

Feltételezésünket, miszerint a védett dihidroxiaceton származékok (XI-4a-d vs. XI-5a-d) esetében a sütőésztővel végzett redukciókban a termékek konfigurációja az egyszerű acilezés hatására megfordul, igazoltuk szintetikusán hasznos R csoportok (benzoil, benzil, pivaloil, *tert*-butildimetilszilil) felhasználásával (14. Táblázat). Látható, hogy minden vizsgált esetben a hidroximetil ketonokból (XI-4a-d) képződő diolok (XI-6a-d) és az acetoximetil ketonokból (XI-5a-d) képződő monoacetátok (XI-7a-d) illetve diolok (*ent*-XI-6a-d) ellentétes konfigurációjúak voltak⁶⁹. A vizsgálatok során számos esetben igen magas enantiomer tisztaságú termékekhez (XI-6a, XI-7b, XI-7d) jutottunk.

14. Táblázat Dihidroxiaceton származékok (XI-4a-d és XI-5a-d) redukciója sütőélesztővel

									
R	Term. %	Konf.	E.t. %	Term. %	Konf.	E.t. %	Term. %	Konf.	E.t. %
	80	S	> 97	54	R ^b	68	22	R	19
	71	S	72	56	R ^b	>95	9	R	46
	50	S	55	60	S ^b	85	20	R	33
	21	S	59	21	R ^b	> 97	25	R	77

^a Általános reakciókörülmények: 500 mg keton (XI-4a-d, 5a-d), 0.15 M pH= 7 foszfát puffer, sütőélesztő (Budafok). További részleteket: ld. XI. melléklet; ^b A csoportok rangsorbeli változásának eredményeképp a benziloxi termék (XI-7c) esetében az S konfiguráció geometriai értelemben ugyanazt a térállást jelenti, mint a többi acetáté (XI-7a,b,d).

IRODALOM A 2. FEJEZETHEZ

1. Poppe, L.; Novák, L. *Magy. Kém. Lapja*, **1988**, *43*, 237.
2. Poppe, L.; Novák, L. *Biokatalízis a szintetikus kémiában* [A kémia újabb eredményei, 73], Akadémiai Kiadó: Budapest, **1991**.
3. Poppe, L.; Novák, L. *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*, Verlag Chemie: Weinheim-New York, **1992**.
4. Novák, L.; Rohály, J.; Baán, G.; Vinzer, P.; Poppe, L.; Kovács, P.; Tóth, M.; Varjas, L.; Szöcs, G.; Szántay, Cs.: Preparation of Insect Hormones and Pheromones, in "Proceedings of the First Korea-Hungary Joint Seminar on Organic Chemistry", Budapest, **1992**, p. 19.
5. Poppe, L.; Novák, L.; Dévényi, J.; Szántay, Cs., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 2643.
6. Novák, Cs.; Poppe, L.; Novak-Fodor, M.; Pfundtner, P.; Bukva, A.: Thermal investigation of cyclodextrin complexes of optically active citronellol derivatives, *2nd Symposium on Pharmacy and Thermal Analysis*, Genf, Svájc, **1995**. október 17-19.
7. Tóth, M.; Helmchen, G.; Leikauf, U.; Sziráki, Gy.; Szöcs, G., *J. Chem. Ecol.*, **1989**, *15*, 1535.
8. Francke, W.; Franke, S.; Tóth, M.; Szöcs, G.; Guerin, P.; Arn, H., *Naturwissenschaften*, **1987**, *74*, 143.
9. Rama, F.; Capuzzi, L., *Synth. Commun.*, **1989**, *19*, 1051.
10. Kovalev, B. G.; Sorochnikova, A. M., *Chem. Nat. Compd.*, **1991**, *27*, 745.
11. Ciocan-Tarta, I.; Oprean, I.; Ghizdavu, I.; Pojar-Fenesan, M., *Rev. Roum. Chim.*, **1998**, *43*, 215.
12. Mori, K.; Wu, J., *Liebigs Ann. Chem.*, **1991**, *5*, 439.
13. Poppe, L.; Novák, L.; Kajtar-Peredy, M.; Szántay, Cs., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 2211.
14. Janssen, A. J. M.; Klunder, A. J. H.; Zwanenburg, B., *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 7409.
15. Egri, G.; Baitz-Gács, E.; Poppe, L., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 1437.
16. Poppe, L.; Egri, G.: Enantiomer Selective Biotransformations of 2-Acylated 1,2-Diols, *BIOTRANS'95*, Warwick, Anglia, **1995**. september 5-8., p. 20.
17. Egri, G.; Poppe, L.: Enzymatic Optical Resolution of 1,2-Diols, *The 7th International Symposium on Chiral Discrimination, 7th ISCO*, Jeruzsálem, Izrael, **1995**. november 12-16.
18. Poppe, L.; Recseg, K.; Novák, L., *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 3993.
19. Rakels, J. L. L.; Straathof, A. J. J.; Heijnen, J. J., *Enzyme Microb. Technol.*, **1993**, *15*, 1051.
20. Poppe, L.; Novák, L.; Kolonits, P.; Bata, Á.; Szántay, Cs., *Tetrahedron*, **1988**, *44*, 1477.

21. Novák, L.; Rohály, J.; Poppe, L.; Hornyánszky, G.; Kolonits P.; Zelei, I.; Fehér, I.; Fekete, J.; Szabó, É.; Zahorszky, U.; Jávör, A.; Szántay, Cs., *Liebigs Ann. Chem.*, **1992**, 145.
22. Mohr, P.; Waespe-Saracevic, N.; Tamm, C.; Gawronska, K.; Gawronski, J. K., *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 2501.
23. Herold, P.; Mohr, P.; Tamm, C., *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 744.
24. Ackermann, A.; Waespe-Saracevic, N.; Tamm, C., *Helv. Chim. Acta* **1984**, 67, 254.
25. Van Middlesworth, F.; Wang, Y. F.; Zhou, B. N.; Di Tullio, D.; Sih, C. J., *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 961.
26. Lam, L. K. P.; Hui, R. A. H. F.; Jones, J. B., *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 2047.
27. Poppe, L.: *Potenciális növényvédőszer sztereoszелеktív szintézise*, Kandidátusi értekezés, 1986.
28. Santaniello, E.; Chiari, M.; Ferraboschi, P.; Trave, S., *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 1567.
29. Van der Meer, R. K.: *Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites*; Westview Press: Boulder, Colo., 1998.
30. Ritter, F. J.; Büggemann-Rotgans, T. E. M.; Verwiel, P. E. J.; Persoons, C. J.; Talman, E., *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 2617.
31. Kobayashi, M.; Koyama, T.; Ogura, K.; Seto, F.; Ritter, F. J.; Brüggenmann-Rotgans, T. E. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 6602.
32. Knight, D. W.; Ojihara, B., *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 5101.
33. Baker, R.; Billington, D. C.; Ekanayake, N., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1983**, 7, 1387.
34. Mori, K.; Ueda, H., *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 461.
35. Mori, K.; Ueda, H., *Tetrahedron*, **1982**, 38, 1227.
36. Poppe, L.; Novák, L.; Kolonits, P.; Bata, Á.; Szántay, Cs., *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 5769.
37. Mori, K.; Murata, N., *Liebigs Ann. Org. Bioorg. Chem.*, **1995**, 12, 2089.
38. Egri, G.; Fogassy, E.; Novák, L.; Poppe, L., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 547.
39. Parham, W. E.; Reed, L. J., *Org. Synth.*, **1955**, Coll. Vol. 3., 395.
40. Fuson, R. C.; Parham, W. E.; Reed, L. J., *J. Org. Chem.*, **1946**, 11, 194.
41. Kremers, J. A.; Meijer, E. W., *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 4264.
42. Ozoe, Y.; Eto, M., *Agric. Biol. Chem.*, **1982**, 46, 411.
43. Friedrich, K.; Thieme, H. K., *Chem. Ber.*, **1970**, 103, 1982.
44. Sheikh, Z.; Steel, R.; Tasker, A. S.; Johnson, A. P., *Chem. Commun.*, **1994**, 763.
45. Bóday, V.; Novák, L.; Poppe, L., *SynLett*, **1999**, 759.

46. Bódai, V.; Novák, L.; Poppe, L.: Synthesis and Lipase-catalyzed Enantioselective Acetylation of 2-Benzoyloxy-1,3-propanediol, *IUPAC Congress on Chemistry*, 1999. augusztus 15-19., Berlin, Németország
47. Egri, G.; Bálint, J.; Peredy, R.; Fogassy, E.; Novák, L.; Poppe, L., *J. Mol. Catal. B, Enzymatic*, 1999, közlésre beküldve.
48. Poppe, L.; Egri, G.; Bálint, J.; Bódai, V.; Szakács, Gy.; Fogassy, E.; Novák, L.: Biocatalytic preparation of chiral glycerol derivatives, *Biotrans'99*, 1999. szeptember 26 - október 1., Giardini Naxos, Olaszország.
49. Caer, E.; Kindler, A. *Biochemistry* 1962, 1, 518.
50. Dennis, E. A. *Bio/Technology* 1987, 5, 1294.
51. Hirth, G.; Barner, R. *Helv. Chim. Acta* 1982, 65, 1059.
52. Jurczak, J.; Pikul, S.; Bauer, T. *Tetrahedron* 1986, 42, 447.
53. Murata, M.; Terao, Y.; Achiwa, K.; Nishio, T.; Seto, K. *Chem. Pharm. Bull.*, 1989, 10, 2670.
54. Terao, Y.; Murata, M.; Achiwa, K.; Nishio, T.; Akamitsu, M.; Kamimura, M. *Tetrahedron Lett.*, 1988, 29, 5173.
55. Ghisalba, O.; Lattmann, R.; Gygax, D. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 1991, 110, 263.
56. Wang, Y. F.; Lalonde, J. J.; Momongan, M.; Bergbreiter, D. E.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 7200.
57. Breitgoff, D.; Laumen, K.; Schneider, M. P. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986, 1523.
58. Wirz, B.; Schmid, R.; Foricher, J. *Tetrahedron:Asymmetry* 1992, 3, 137.
59. Suemune, H.; Mizuhara, Y.; Akita, H.; Sakai, K. *Chem. Pharm. Bull.*, 1986, 34, 3440.
60. Kerschner, V.; Kreiser, W.; *Tetrahedron Lett.*, 1987, 28, 531.
61. Matsuzaki, T.; Shinozaki, Y.; Hagimori, M.; Tobita, T.; Shigematsu, H.; Koiwai, A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1992, 56, 1565.
62. Carlsen, P. H. J.; Soerbye, K.; Ulven, T.; Aasboe, K. *Acta Chem. Scand.* 1996, 50, 185.
63. Theil, F.; Weidner, J.; Ballschuh, S.; Kunath, A.; Schick, H., *J. Org. Chem.*, 1994, 59, 388.
64. Theil, F.; Lemke, K.; Ballschuh, S.; Kunath, A.; Schick, H., *Tetrahedron:Asymmetry*, 1995, 6, 1323.
65. Manzocchi, A.; Fiecchi, A.; Santaniello, E., *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 4405.
66. Aragazzini, F.; Maconi, E.; Pontenza, C.; Scolastico, C., *Synthesis* 1989, 225.
67. Sato, T.; Mizutani, T.; Okumura, Y.; Fujisawa, T., *Tetrahedron Lett.*, 1989, 30, 3701.
68. Egri, G.; Kolbert, A.; Bálint, J.; Fogassy, E.; Novák, L.; Poppe, L., *Tetrahedron:Asymmetry*, 1998, 9, 271.
69. Bálint, J.; Egri, G.; Kolbert, A.; Dianóczky, Cs.; Fogassy, E.; Novák, L.; Poppe, L., *Tetrahedron:Asymmetry*, 1999, 10, 4107.

70. Cesarotti, E.; Antognazza, P.; Pallavicini, M.; Villa, L. *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 2344.
71. Karrer, F.; Kayser, H.; Buser, H. P.; Tombo, G. M. R. *Chimia*, **1993**, *47*, 302.
72. Buser, H. P.; Spindler, F. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *12*, 2451.
73. Waagen, V.; Partali, V.; Hollingsaeter, I.; Huang, M. S. S.; Anthonsen, T. *Acta Chem. Scand.*, **1994**, *48*, 506.
74. Guette, J.P.; Spassky, N. *Bull. Soc. Chim. France* **1972**, 4217.
75. Barry, J.; Kagan, H.B. *Synthesis* **1981**, 453.
76. Manzocchi, A.; Fiecchi, A.; Santaniello, E. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4405.
77. Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A.; Santaniello, E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1990**, 2469.
78. Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A.; Santaniello, E. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10539.

3. BIOKATALÍTIKUS FOLYAMATOK MECHANIZMUSVIZSGÁLATA

Az enzimkatalizált folyamatok megértése és a folyamatok mechanizmusának - az 1.2. fejezetben tárgyalt módszerek segítségével történő - molekuláris szintű megismerése nagymértékben hozzájárul a biokatalízis alkalmazásának további fejlődéséhez illetve új területek kialakulásához.

Ilyen, molekuláris szintű enzimmechanizmus vizsgálatokba más mikrobiológiai, biokémiai, molekuláris-genetikai, fehérjekrisztallográfiai vizsgálatokkal foglalkozó kutatócsoportok tevékenységéhez kapcsolódva és azzal összhangban két területen - a fenilalanin ammonia-liáz és a B₁₂-koenzim függő enzimek hatásmechanizmusának vizsgálatai - fogtunk bele.

3.1. A FENILALANIN AMMÓNIA-LIÁZ VIZSGÁLATA

A fenilalanin ammonia-liáz (EC 4.3.1.5; PAL) és a hozzá igen hasonló folyamatot katalizáló hisztidin ammónia-liáz (EC 4.3.1.3; HAL, amely a legtöbb sejtben a hisztidin lebontás kezdeti lépését végzi) nagyfokú hasonlóságot mutató enzimek. A bakteriális vagy emlős eredetű HAL és a növényi eredetű vagy gombákból származó PAL enzimek genetikailag is igen hasonlóak ¹.

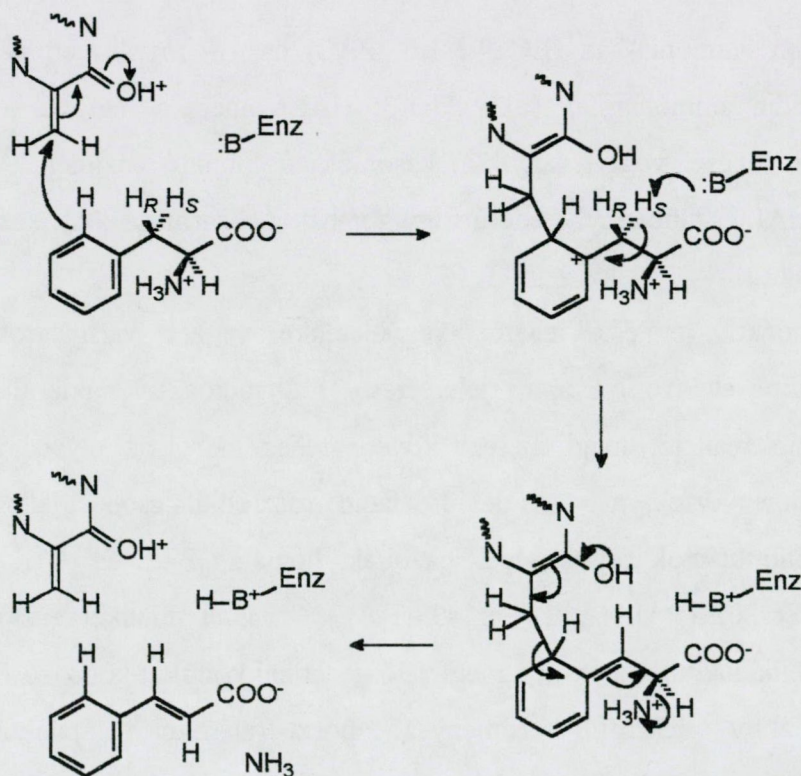
Korai, radioaktív jelöléssel ellátott vegyületekkel végzett vizsgálatok már jelezték a katalízisben fontos elektrofil csoport jelenlétét ²⁻⁴. A radioaktív nukleofilekkel (K¹⁴CN ill. NaB³H₄) történő reakció, majd az ezt követő teljes hidrolízis olyan radioaktívan jelölt termékeket eredményeztek, melyek a dehidroalanin prosztetikus csoport jelenlétét jelezték.

Később pontmutációk segítségével igazolták, hogy a PAL és HAL enzimekben ezek prekurzorai a Ser202 (PAL) ⁵ ill. Ser143 (HAL) ⁶. Mivel mindkét enzim aktív formában képződik a genetikailag módosított, a megfelelő genetikai kódokat hordozó *E. coli* sejtekből, a szerinből az aktív elektrofil eredményező poszt-transzlációs átalakulási folyamatnak autokatalitikus módon kell lezajlania ^{7,8}.

A HAL enzim nemrég megismert röntgenszerkezete azt mutatta ⁹, hogy az aktív elektrofil valójában nem dehidroalanin, hanem egy aminosav triádból (Ala142-Ser143-Gly144) képződő 4-metilénimidazol-3-on (MIO) egység. Ez a planáris gyűrűs szerkezetű, elektrofil jellegű metilén szubsztituenst tartalmazó aktív egység valójában módosított dehidroalaninként kezelhető. A MIO képződésének mechanizmusa egyelőre nem tisztázott, azonban említésre méltó, hogy a "green fluorescent protein" imidazolon kromofór egységének hasonló autokatalitikus folyamatban kell képződnie ¹⁰⁻¹².

Az elektrofil prosztetikus csoport esszenciális katalitikus szerepének felismerése után a reakció mechanizmusát megpróbálták úgy értelmezni, hogy az elektrofil egység a szubsztrát aminocsoportjával Michael típusú addíciós reakcióba lép ¹³. Ez megnövelné ugyan az eliminációs reakcióban az aminocsoport távozókészségét, ám nyitva hagyja a kérdést: hogyan képes egy az enzim aktív helyén lévő bázikus csoport a szubsztrát nem savas karakterű β -helyzetű hidrogénjének protonként történő lehasítására?

Ennek értelmezésére a fenilalanin ammónia liáz (PAL) mechanizmusára egy újabb - a dehidroalanin (ill. MIO metilén) enzimatisz elektrofil támadásával kezdődő Friedel-Crafts típusú folyamatot feltételező - javaslat született ^{14, 15} (25. Ábra).

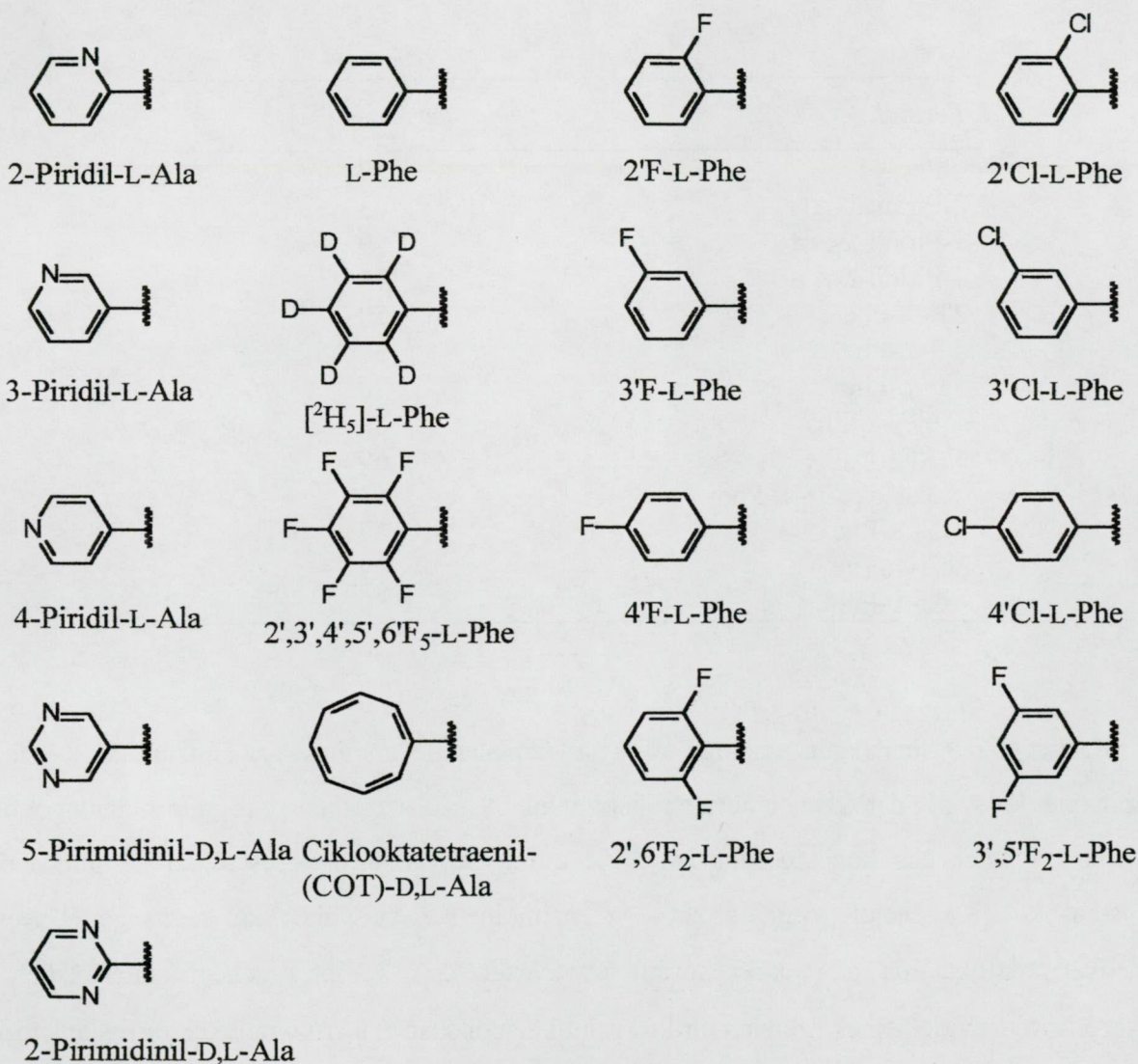
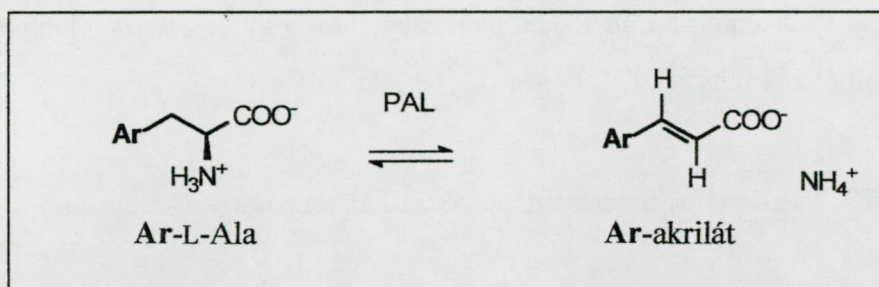


25. Ábra A fenilalanin ammónia-liáz (PAL) reakció javasolt mechanizmusa

E feltételezett reakciómechanizmus vizsgálata kapcsán tanulmányoztuk L-fenilalanin analogonok előállítását és enzimkinetikáját, illetve különféle elméleti számításokat végeztünk (XII. melléklet ¹⁶, XIII. melléklet ¹⁷).

3.1.1. L-Fenilalanin analogonok előállítása és vizsgálata PAL enzimmal

A fenilalanin ammonia-liáz katalizált reakció vizsgálatához számos nem természetes L-fenilalanin analogont használtunk fel (26. Ábra).



26. Ábra A fenilalanin ammónia-liáz vizsgálata során felhasznált L-fenilalanin analogonok.

A fenilalanin ammónia-liáz katalizált folyamat reverzibilitása felhasználható nagy enantiomer tisztaságú L-fenilalanin analogonok előállítására: magas ammónium ion koncentráció alkalmazásakor az ammónia magas enantiotóp szelektivitással (a termékek enantiomer tisztasága minden esetben 99 % feletti) addicionál a megfelelő β -aril-akrilátokra. Ez a folyamat az enzimkinetikai vizsgálatok során felhasznált vegyületek egy részének előállítása során is alkalmazható volt (15. Táblázat).

15. Táblázat A fenilalanin ammónia-liáz preparatív alkalmazása

$$\text{Ar}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COO}^- \xrightleftharpoons[\text{PAL}]{5 \text{ M NH}_4^+} \text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{NH}_3^+$$

E.t. > 99 %

<i>Termék</i>	<i>Termelés [%]</i>
L-Phe	52
2-Piridil-L-Ala	63
3-Piridil-L-Ala	59
4-Piridil-L-Ala	75
2'F- L-Phe	50
3'F- L-Phe	59
4'F- L-Phe	70
2',6'F ₂ - L-Phe	88
3',5'F ₂ - L-Phe	69
2',3',4',5',6'F ₅ - L-Phe	51
2'Cl- L-Phe	37
3'Cl- L-Phe	99
4'Cl- L-Phe	59

Ezeket az L-fenilalanin analogonokat a fenilalanin ammonia-liáz enzimmal végzett enzimkinetikai vizsgálatokban lehetett felhasználni. A szubsztrátként elfogadott analogonok esetében a Michaelis konstansokat (K_m , V_{max}), míg az inhibitorok esetében az inhibíciós konstansokat (K_i) lehetett meghatározni. Az enzimkinetikai vizsgálatokkal segítségével nyert kinetikai adatokat és a reakció során feltételezhető, σ -komplex jellegű intermedierek egyszerűsített modelljeinek szemiempirikus szintű számításaival a σ -komplexelek egyes jellemző számított adatait együtt értelmezve próbáltuk meg a feltételezett mechanizmust alátámasztani.

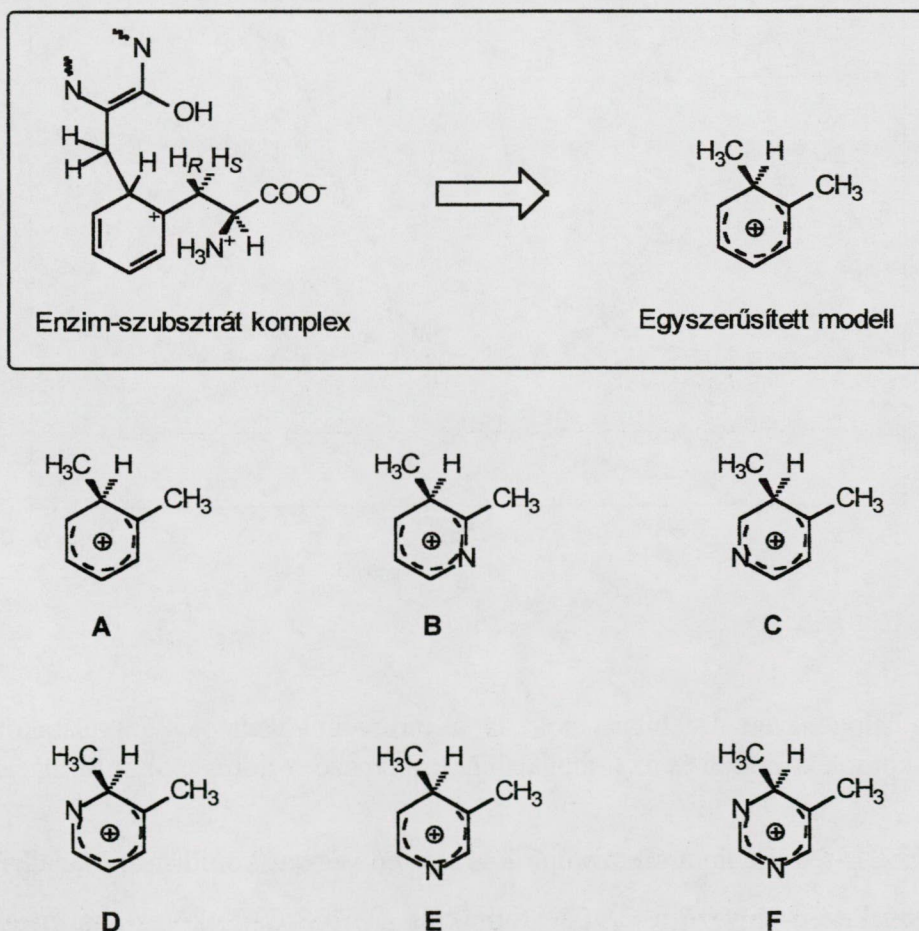
3.1.2. A fenilalanin ammónia-liáz reakció vizsgálata elméleti számításokkal

A reakció során intermedierként feltételezett σ -komplekek relatív stabilitására ill. a β -helyzetű hidrogének relatív savasságára vonatkozó adatokat a megfelelő, egyszerűsített σ -komplekek szemiempirikus (AM1, PM3 ill. MNDO) szinten végzett számításai segítségével határoztuk meg (XII. melléklet ¹⁶, XIII. melléklet ¹⁷).

A szubsztrát valószínű reaktív konformációját PM3 szinten végzett konformációanalízissel, az apoenzim részleges aktív centrum modelljét a HAL szerkezet felhasználásán alapuló homológia modellezés segítségével vizsgáltuk (XIII. melléklet ¹⁷)

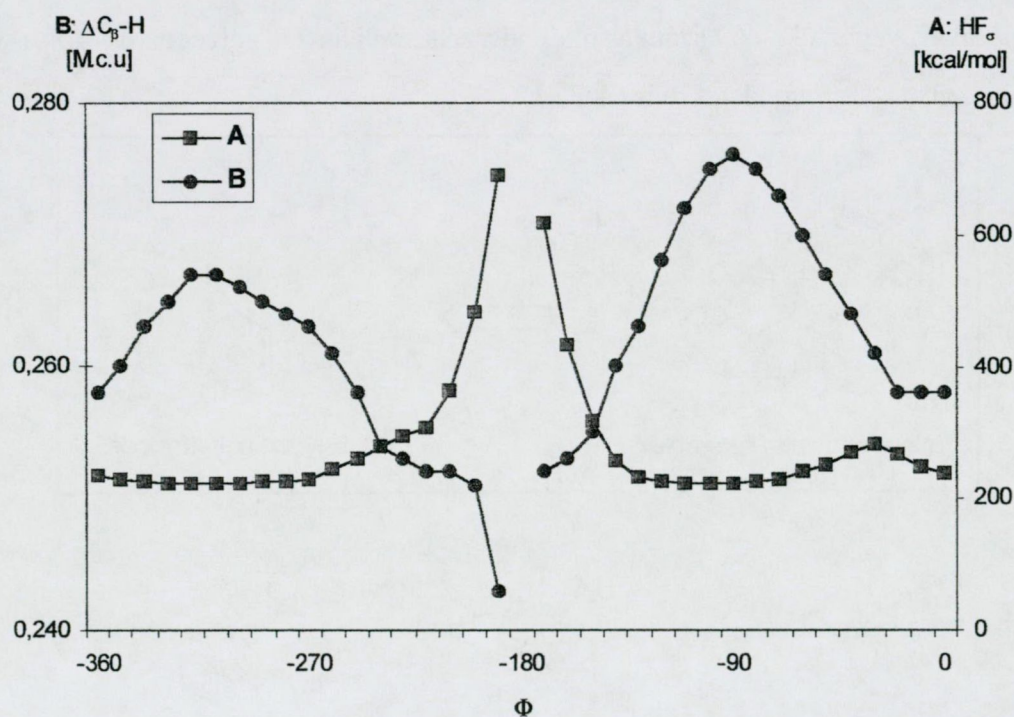
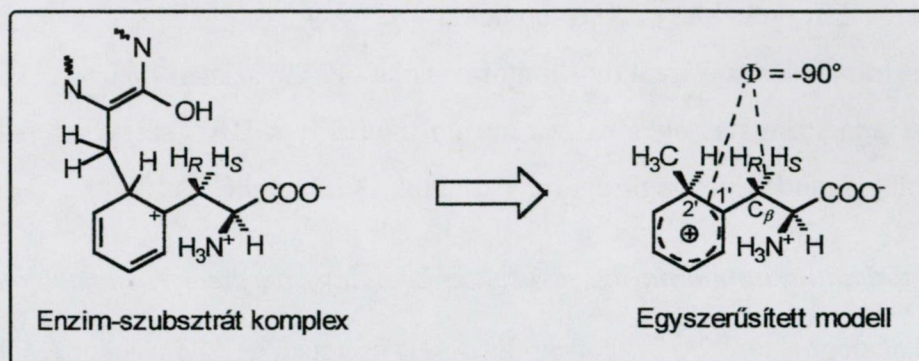
3.1.2.1. A fenilalanin ammónia-liáz javasolt σ -komplex intermediereinek vizsgálata

A piridil analogon sor (2-, 3- ill 4-piridil-L-Ala) esetében a számításokat (MNDO, AM1, PM3; vákuum) a 27. Ábrán feltüntetett egyszerűsített σ -komplekek (B, C, D, E) felhasználásával végeztük. A számításokat összehasonlításként elvégeztük az L-Phe ill. β -(5-pirimidinil)-L-Ala vegyületekre is (A ill. F).



27. Ábra A piridil analogonok vizsgálatokor használt egyszerűsített σ -komplekek

A halogénezett analogonok ill. a pirimidinil származékok vizsgálata során a szubsztrát ikerionos formáját és a MIO metilénje helyén metil csoportot tartalmazó σ -komplexekeket használtunk, és a konformációs viszonyok tisztázása érdekében az L-fenilalaninnak megfelelő modellen PM3 szintű konformáció-analízist¹⁸ végeztünk (28. Ábra, XIII. melléklet¹⁷).

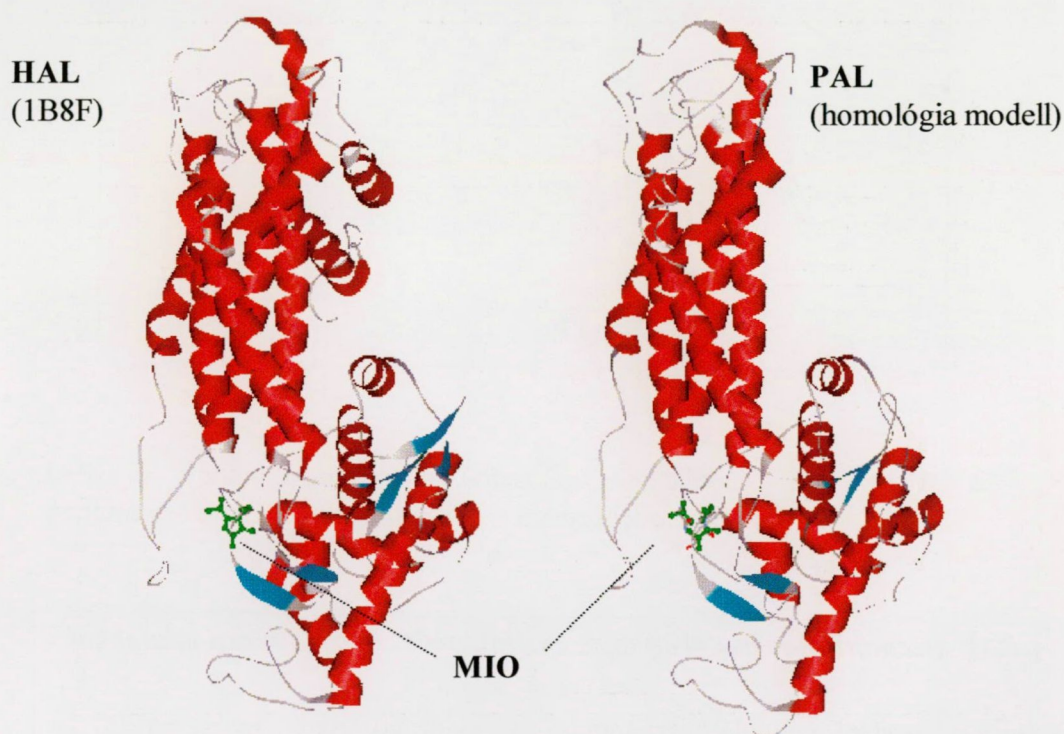


27. Ábra A halogénezett L-fenilalaninok és a pirimidinil-alaninok vizsgálatokor használt σ -komplex-modell és az L-fenilalanint tartalmazó σ -komplex konformáció-analízise

Az ikerionos L-fenilalaninra szemiempírikus szinten végzett konformáció-analízis szerint a legfontosabb szerkezeti tényező a $C_1'-C_2'$ atomok és a *pro-S* $C_\beta-H$ kötés által meghatározott dihedrális szög (Φ). A további számítások során ezt optimumán ($\Phi = -90^\circ$) rögzítettük.

3.1.2.2. A fenilalanin ammónia-liáz homológia modellje

A fenilalanin amónia-liáz (PAL) aminosav-szekvenciájának ismerete (SwissProt kód: P24481, 719 aminosav), illetve a PAL és hisztidin ammónia-liáz (HAL) között fennálló nagy mértékű szekvencia hasonlóság (31 % identitás, 60 % hasonlóság) lehetővé tette a fenilalanin ammónia-liáz 3D szerkezetének homológia modellezés segítségével ¹⁹ végzett felépítését. A 28. ábrán bal oldalt látható a „folding template” gyanánt felhasznált HAL kristályszerkezete (Brookhaven protein adatbank kód: 1B8F), jobb oldalt pedig a PAL szekvencia megfelelő részletéből (ami a MIO csoportnak megfelelő ASG szekvencia szegmenst és az összes HAL és PAL enzimben konzervált GGNFH motívumban megtalálható Phe399-et is tartalmazó 468 aminosavból álló részlet) az erre felépített homológia modell szerkezete.

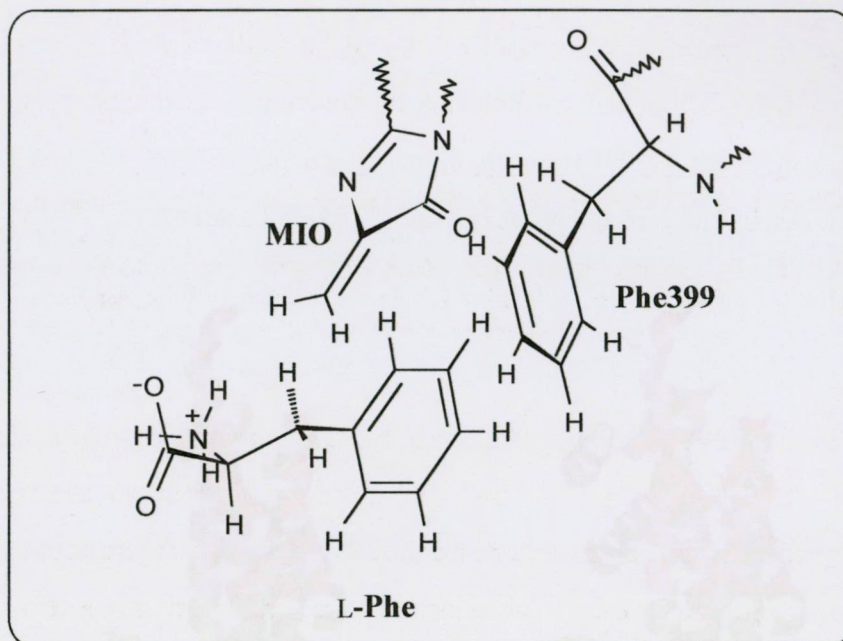


28. Ábra A fenilalanin ammónia-liáz homológia modellezéssel nyert szerkezete. [Bal oldalt: HAL (Brookhaven protein adatbank kód: 1B8F) „folding template”, Jobb oldalt: a PAL szekvencia (P24481) felhasználásával modellezett szerkezet.]

A nyers modellt **Gromos** és **Amber** „force field”-ekkel minimalizáltuk, majd a kötőhely ASG részletét a HAL (PDB:1B8F) struktúrából nyert MIO szerkezettel helyettesítettük (ebben a lépésben a megfelelő atomok pozíciói közti eltérés 0.4 Å -nél kevesebbnek adódott). Az így

nyert részleges PAL aktív hely modellt a szubsztrátok lehetséges illeszkedési konformációinak elemzésére használtuk fel.

Az összes rendelkezésre álló adat azt valószínűsíti, hogy az enzim aktív centrumában a szubsztrát a σ -komplex képződésekor a MIO gyűrűrendszere és a Phe399 fenilcsoportja közt "szendvics"-szerűen közrefogva helyezkedik el (29. Ábra).



29. Ábra Az L-fenilalanin valószínű illeszkedési módja a PAL homológia modellezéssel nyert aktív centrumának részletében.

3.1.2.3. A PAL mechanizmus összevetése az enzimkinetikai és számítási adatokkal

A kísérleti eredményekkel összhangban a fenil komplex és a piridil komplexek képződéshői között kis különbség adódott, de a várt trend igazolódott: a piridin gyűrű *orto* és *para* helyzetével szemben a *meta* helyzetben kedvezményezett az elektrofil támadás (16. Táblázat). Az elektrofil szubsztitúció mértéke és a V_{\max} értékek között nem található összefüggés. Korreláció inkább az enzim-termék komplex disszociációjának mértékével áll fenn, mely (legalábbis) részben sebesség meghatározó. Ezt korábbi kinetikai vizsgálatok eredményei is alátámasztják, a deuterált $[3,3\text{-}^2\text{H}_2]$ fenilalanin szubsztráttal ugyanis nem tapasztalható elsőrendű kinetikus izotóp effektus²⁰. A K_m értékek ugyancsak az enzim-termék komplex disszociációját mutatják sebesség-meghatározónak.

16. Táblázat A fenilalanin piridil és ciklooktatetraenil analogonjainak kinetikus konstansai és az aktív komplex-modell alapján számított értékei (XII. melléklet ¹⁶)

Szubsztrát (σ komplex modell) *		$\Delta\Delta H_{\sigma-g}$ [kcal/mol]	$\Delta\Delta C_{\beta-H_{\sigma-g}}$ [t.c.u]	$V_{max}/V_{max(L-Phe)}$	$K_m/K_{m(L-Phe)}$ [mM]
L-Phe (A)		0.0	0.048	1	1
2-Piridil-L-Ala (B)		4.3	0.059	0.8	22.0
3-Piridil-L-Ala (D)		13.7	0.072	2.4	41.6
(E)		17.7	0.065		
4-Piridil-L-Ala (C)		4.8	0.056	1.8	12.1
COT-D,L-Ala				0.0058	22.6

* A megfelelő σ -komplex modellek szerkezete a 27. Ábrán látható; $\Delta\Delta H_{\sigma-g}$: A σ -komplex modellek és a megfelelő alapállapotú aromás vegyület képződéshő-különbsége; $\Delta\Delta C_{\beta-H_{\sigma-g}}$: A σ -komplex modellek C_{β} -H helyzetnek megfelelő metil-H atomjai teljes atomi töltései átlagának és a metil-C teljes atomi töltésének különbsége a megfelelő aromás alapvegyület hasonló értékeihez viszonyítva (tk. a polarizáltság növekedése); $V_{max}/V_{max(L-Phe)}$: ill. $K_m/K_{m(L-Phe)}$: az analogok L-Phe-re vonatkoztatott relatív V_{max} ill K_m értékei.

A piridil izomerek a PAL enzim jó szubsztrátjának bizonyultak (16. Táblázat), esetükben viszonylag laza kötődés (magas K_m), ám a telítettségi koncentráció esetén a természetes szubsztráttal egyező vagy azt meghaladó reakciósebesség (V_{max}) volt tapasztalható. A 2-piridil-L-alanin különleges szubsztrát, mert a bár a piridin nitrogénjén történő elektrofil támadás inert piridinium komplexhez vezethet, a vegyület (feltehetően a B jellegű σ -komplexen át) a természetes szubsztráttal közel egyező sebességgel reagál.

A piridil analogonok átalakulása az enzim aktív helyén - eltérően a kémiai folyamattól, ahol a bázikus nitrogén reagálna először a nukleofillel - a piridil gyűrű protonálódása nélkül játszódik le. Ezt a számítások is igazolják, hiszen a protonált piridinből keletkező σ -komplex képződéshője a neutrális piridinéhez képest mintegy kétszer akkora (~440 kcal/mol) adódott. A részleges aktív centrum modell is ezt igazolja: a MIO és a Phe399 közé kerülő aromás gyűrű közelében nem található protonálni képes savas oldallánc, így tehát az aromás gyűrűt kötő hidrofób zsebbe kerülő piridil csoportot az enzim megvédi a protonálódástól.

A piridil csoport nagyobb polaritását összehasonlítva a fenil gyűrű polaritásával érthetővé válik a nagyobb K_m értékekkel jellemzett, csökkenő kötő affinitás és az enzim-termék komplex disszociációjának nagyobb sebessége. Ennek megfelelően a piridilakrilátok - melyek a piridil-L-alaninok PAL-al történő reakciójának termékei - K_i értéke egy nagyságrenddel nagyobb mint a fahéjaldehidé. A fenil gyűrűn perdeuterált fenilalaninnal ($[^2H_5]$ -L-Phe) tapasztalt szekunder izotóp effektus ¹⁶ ugyancsak megerősíti az előbbieket.

A halogénezett és pirimidinil analogonok vizsgálatakor elvégzett konformációanalízis szerint (27. Ábra) a szubsztrát ikerionos szerkezetét feltételezve két olyan kedvező elrendeződést találtunk, ahol a *pro-S* H_β és az -N⁺H₃ csoport antiperiplanáris helyzetű, a gyűrű oldallánca pedig cikk-cakk szerűen nyújtott. Az analogonokkal végzett további számításokhoz ezek közül a kedvezőbb, és a részleges aktív centrumba jobban illeszthető állapotot [rögzített dihedrális szög, $\Phi = -90^\circ$] tartalmazó elrendeződést használtuk. A rotációval kétféle σ -komplex kialakulására lehetőséget nyújtó vegyületek esetében a számítások során mindkét aktív komplexet figyelembe vettük. Az e vegyületekre számított és enzimkinetikai vizsgálatukkal nyert adatok a 17. Táblázatban találhatók.

17. Táblázat A halogénezett és pirimidinil fenilalanin analogonok kinetikus konstansai és az aktív komplex-modell alapján számított értékei (XII. melléklet ¹⁷)

Szubsztrát (σ -komplex modell) *		$\Delta\Delta H_{\sigma-g}$ [kcal/mol]	$\Delta\Delta C_{\beta-H_{\sigma-g}}$ [M.c.u]	$V_{max}/V_{max-Phe}$	K_m [mM]
L-Phe		0.0	0.184	1.00	0.033
2'F- L-Phe	(A)	15.7	0.135	1.14	0.065
	(B)	7.8	0.129		
3'F- L-Phe	(A)	3.1	0.109	2.09	0.079
	(B)	1.5	0.116		
4'F- L-Phe		7.6	0.128	0.56	0.010
2',6'F ₂ - L-Phe		21.9	0.160	0.85	0.085
3',5'F ₂ - L-Phe		4.8	0.037	2.72	0.159
2',3',4',5',6'F ₅ - L-Phe		29.9	0.141	0.16	0.076
2'Cl- L-Phe	(A)	7.4	0.117	1.03	0.050
	(B)	5.2	0.115		
3'Cl- L-Phe	(A)	-1.7	0.100	2.01	0.094
	(B)	-4.2	0.102		
4'Cl- L-Phe		3.2	0.126	0.82	0.045
β -(5-Pirimidinil)-D,L-Ala		25.8	0.229	0.80	4.2
β -(2-Pirimidinil)-D,L-Ala		-24.0	-0.314	0.00	(K _i = 7 mM)

* Olyan esetekben ahol a σ -komplex kialakulását megelőzően a szubsztrát fenil gyűrűjének elfordulásával két különböző σ -komplex kialakulására van lehetőség, az A jelű struktúra az, melyben a halogén szubsztituens a σ -komplex sp³ centrumához közelebb helyezkedik el; $\Delta\Delta H_{\sigma-g}$: a szubsztituált σ -komplexek és a megfelelő szubsztrát-modell képződéshő-különbsége az L-Phe aktív komplex-modell és az alapállapotban lévő L-Phe képződéshőinek különbségéhez viszonyítva; $\Delta\Delta C_{\beta-H_{\sigma-g}}$: az aktív komplexek C_β-H atomjainak Mulliken töltés-különbsége a megfelelő szubsztrát hasonló értékeihez viszonyítva; $V_{max}/V_{max-Phe}$: az analógok L-Phe-re vonatkoztatott relatív V_{max} értékei.

A halogénezett fenilalaninok PAL enzimmal mért *kinetikai állandóit* vizsgálva a következő megállapításokat tehetjük.

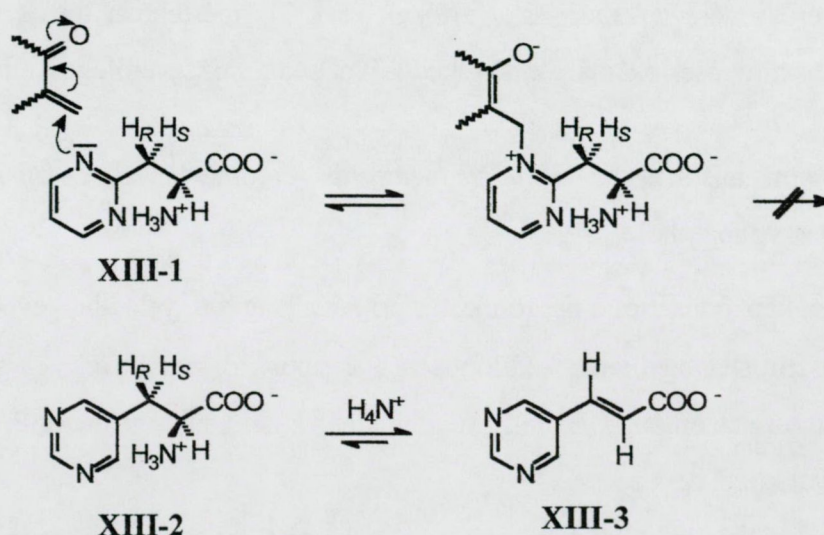
- A 3'-helyzetben halogénezett fenilalaninok a V_{\max} értékek tanulsága szerint jelentősen gyorsabban reagálnak, mint a szubsztituálatlan fenilalanin. Ez összhangban van a MIO aromás gyűrűn történő elektrofil támadásával. A 3'-helyzetben lévő halogén szubsztituens - a kationos átmeneti állapot stabilizációjával - *orto* és *para* helyzetben könnyíti meg a támadást. A szubsztrát kötődését megelőzően a szubsztrát fenil gyűrűjének szabad rotációja mindkét pozíciót elérhetővé teszi a sztérikusan gátolt MIO támadásának. Ez az effektus hasonló a 3'-hidroxifenilalanin esetén találtakkal¹⁴.
- A fenil gyűrű halogén szubsztituense szintén befolyásolhatja az oldallánc β -protonjának savasságát. Míg neutrális alapállapotban ez az effektus aktiválja a β -protont, addig a kationos köztitermék esetén ellenkező hatást fejt ki. Amikor a pozitív töltés delokalizálódik a halogén atomokon, a gyűrű elektronhiánya csökken, csökkentve ezzel az oldallánc β -protonjának savasságát is. A halogén szubsztituens hatása a savasságra ugyanakkor lényegesen kisebb, mint a nitrocsoporthé.
- Összességében a β -proton lehasadása jó szubsztrátok esetén sem tűnik sebesség-meghatározó lépésnek, mint azt a korábban említett izotóp-jelöléses vizsgálatok is megerősítették. A MIO csoport támadása részben sebesség-meghatározó, ugyanakkor a többi sebesség-meghatározó lépés inkább termék-függőnek látszik. E két lépés kinetikus jelentősége azonban szubsztrát-függő.
- A kötődés erősségére jellemző K_m értékek csak kis mértékben tértek el egymástól, a halogén szubsztituensek számának növekedésével pedig hozzávetőlegesen növekedtek.

A kinetikai konstansokat az *elméleti számítás* eredményeivel összevetve az alábbi következtetéseket vonhatjuk le.

- A σ -komplex képződését és a hasadó kötés polarizáltságát figyelembe véve a 2'-F-, 2'-Cl- és a 4'-Cl-szubsztituált vegyületek - különösen a B típusú σ -komplexek - a szubsztituálatlan L-fenilalaninhoz hasonlóak. Ennek megfelelően kinetikus viselkedésük a természetes szubsztrátéval közel egyező.
- A feltételezett aktív hely modell szerint a szubsztrát aromás gyűrűjét szendvics-szerűen fogja közre a MIO és a Phe399 fenil gyűrűje. Ez az elrendezés lehetővé teszi a MIO π rendszerének és az aromás gyűrű π rendszer C_2 helyzetének maximális átlapolását.

A kialakuló σ -komplexben a 2'-hidrogént valószínűleg a Phe399 fenil csoprotjával alkotott "charge-transfer" ill. π -komplex stabilizálja, ami megakadályozza a szubsztrát aromás gyűrűjének proton-kilépéssel lejártszódó - másként valószínű - rearomatizációját is.

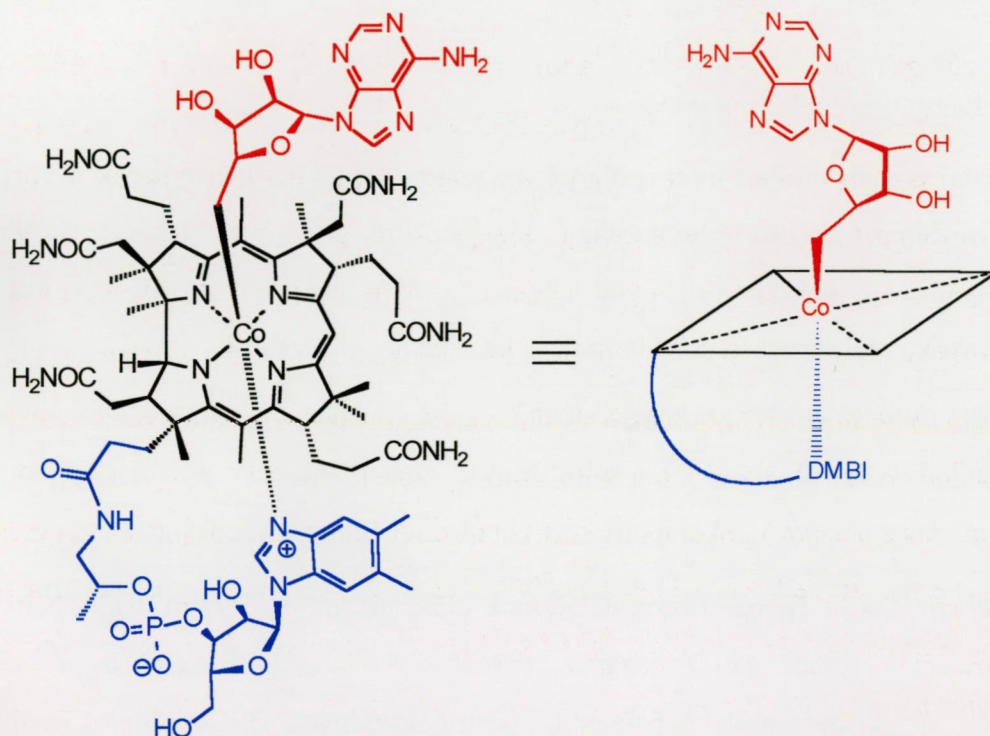
- A 3'-helyen halogénezett származékok esetén a 3'-halogén és a Phe399 aromás π elektronjai között hiperkonjugációs effektus is felléphet, ami csökkentheti a 17. Táblázatban feltüntetett, vákuumban számított energia-értékeket, így értelmezhetővé válik a megnövekedett reakciósebesség.
- A 3',5'-F₂-szubsztituált vegyület alapállapotában a *pro-S* C $_{\beta}$ -H kötés szignifikánsan polarizáltabb, (kb. 0.4 Mulliken töltésegységgel) tehát a *pro-S* β -helyzetben található hidrogén eleve savasabb mint a többi modellben. Ez magyarázhatja a látszólag alacsony polarizáltság növekedés ellenére tapasztalható magas sebességet.
- A pentafluorozott analóg esetén a csökkent sebesség magyarázata az lehet, hogy a Phe399 aromás π elektronjaival létrejövő hiperkonjugációs effektus nem tudja kompenzálni a σ -komplex képződéséhez szükséges többlet-energiát.
- Az 5-pirimidinil vegyület (XIII-2) σ -komplexének képződéséhez relatív nagy energia szükséges, azonban a hasadó *pro-S* C $_{\beta}$ -H kötés polarizáltsága szintén meglehetősen erős. A normál V_{\max} érték mellett ennek megfelelően magas K_m értéket figyelhető meg. A 2-pirimidinil vegyület (XIII-1) esetén tapasztalt inhibíciót a kialakuló kationos pirimidinium komplex stabilitásával és a *pro-S* C $_{\beta}$ -H kötés negatív polarizáltsága miatt kedvezőtlen proton-kihasítással magyarázhatjuk (30. Ábra).



30. Ábra A β -(2-pirimidinil)-alaninnal (XIII-1) kialakuló, további reakcióba nem lépő komplex feltételezett szerkezete és a β -(5-pirimidinil)-alanin (XIII-2) reakciója

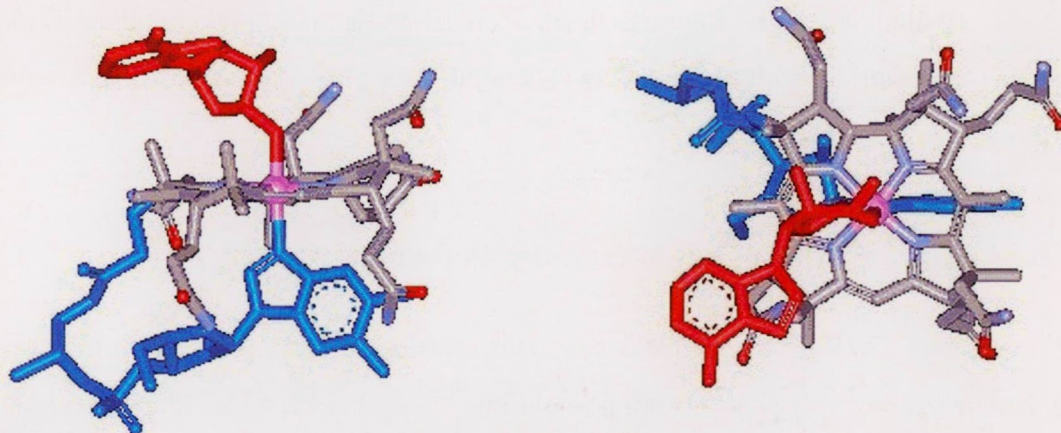
3.2. B_{12} -KOENZIM FÜGGŐ ENZIMEK VIZSGÁLATA ²¹

A természetben számos fontos, gyökös átrendeződéseket katalizáló, a katalitikus folyamatban B_{12} -koenzimet (Ado-Cbl, 31. Ábra) igénylő enzim ismert (1.2.2. Fejezet).



Oldalnézet

Felülnézet

31. Ábra A B_{12} -koenzim (Ado-Cbl) ábrázolása és röntgenszerkezete ²²

A B₁₂-koenzim függő enzimek által katalizált folyamatok közös vonása, hogy a katalitikus ciklus első lépésében a B₁₂-koenzim (Ado-Cbl) kobalt atom és az adenoil ligandum közötti kovalens kötése homolitikusan hasad és az így keletkező gyökös termékek (Co^{II} ill. C₅-gyök) indítják el a szubsztráton a vándorló csoport és egy hidrogén 1,2-vándorlásával járó átrendeződési folyamatot (1.2.2.2. Fejezet, 3. Táblázat).

A B₁₂-koenzim-függő folyamatok vizsgálatát elsősorban a B₁₂-koenzim különféle analogonjainak enzimkinetikai/enziminhibíciós vizsgálatával végeztük. Ehhez többféle B₁₂-koenzim analogon típust állítottunk elő.

A B₁₂-koenzim poszthomolízis intermedierjét modellező analogonok nyerhetők a korrin váz és az adenoil csoport megfelelő hosszúságú szénláncsal történő összekötésével. Ezek az analogonok vizsgálhatók mind mutáz, mind elimináz jellegű enzimekkel, így információ nyerhető az enzimatis folyamatbéli poszthomolízis intermedier állapotáról.

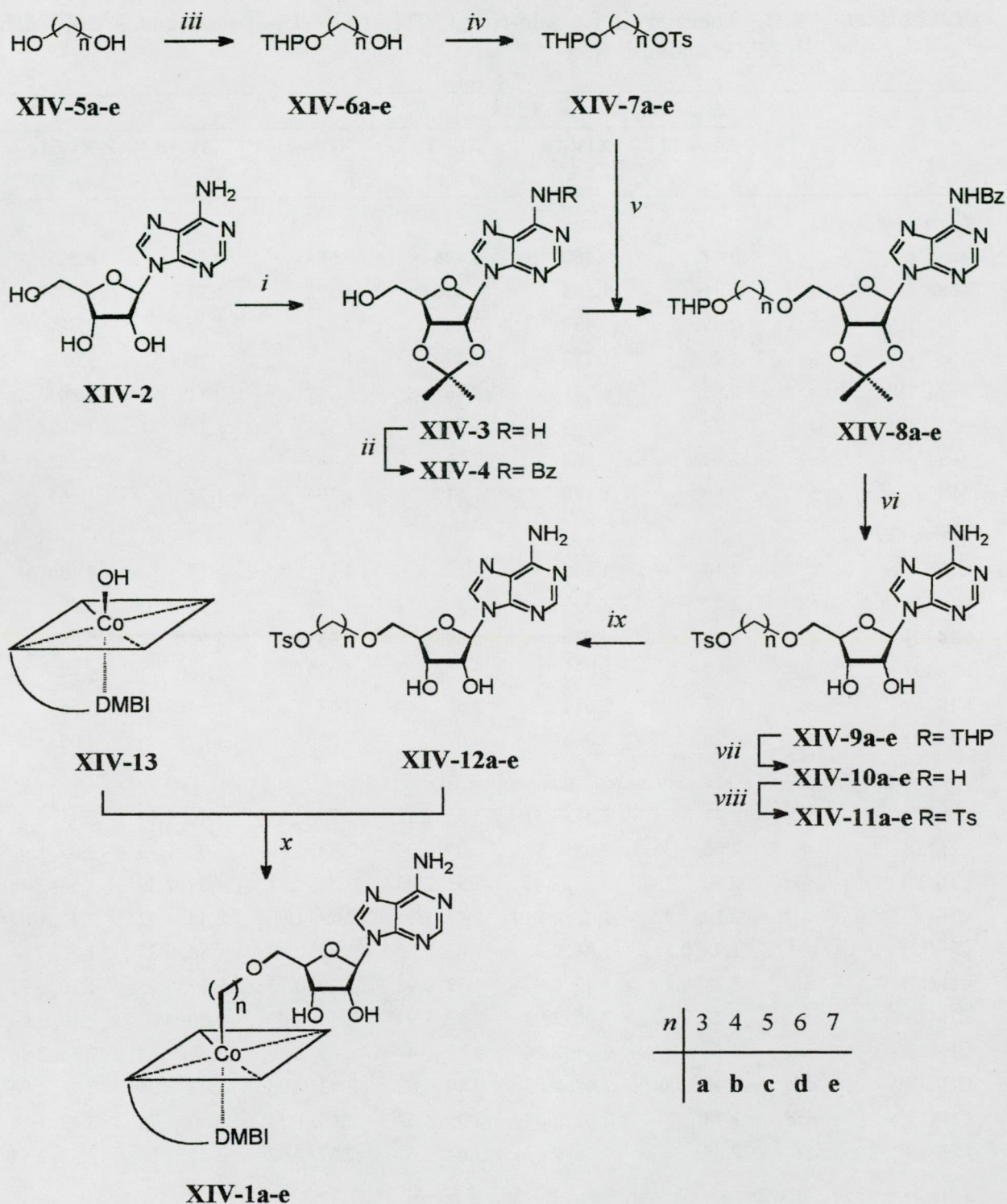
A B₁₂-koenzim csak "base-off" kötődésre alkalmas analogonjának előállításával mód nyílik a B₁₂-koenzim-függő folyamatokban a koenzim kötődésének ("base-on" ill. "base-off", ld. 1.2.2.2. Fejezet, 6. Ábra) enzimkinetikai módszerekkel történő tanulmányozására.

Szubsztrát-korin típusú B₁₂-koenzim analogonok előállításával a szubsztrát kötőhelyről nyerhetünk információt. Ehhez mutáz enzimek vizsgálata esetén sav-funkciót tartalmazó, elimináz enzimek tanulmányozásához hidroxil-csoportot tartalmazó β-ligandumot kell a korrinhoz kötni (ld. 1.2.2.2. Fejezet, 3. Táblázat).

Végezetül előállíthatók a B₁₂-függő enzimek szubsztrát-adenoil típusú inhibitorai, melyek segítségével várhatóan a szubsztrát és az adenoil csoportok reakció közben elfoglalt helyzetéről nyerhetők adatok.

3.2.1. A B₁₂-koenzim poszthomolízis intermedier analogonjai

A B_{12a}-vitamint (XIV-3) a megfelelő adenoil származékokkal (XIV-12a-e) redukálva alkilezve, az enzimatis folyamatokban a homolitikus lépés után képződő állapot analogonjait [XIV-1a-e: Ado-(CH₂)_n-Cbl] állítottuk elő (XIV. melléklet ²³, 32. Ábra).



32. Ábra A B₁₂-koenzim poszthomolízis analogjainak (XIV-1a-e) szintézise

Reagensek: i.) Aceton, kat. 70 % HClO₄, 4 Å MS; ii.) 1. Me₃SiCl, piridin; 2. Bz-Cl, 3. NaF, H⁺, MeOH/H₂O; iii.) DHP, THF, kat. TsOH; iv.) TsCl, piridin, CH₂Cl₂; v.) 1. XIV-4, NaH, DMF, 2. XIV-7; vi.) kat. NaOMe, MeOH; vii.) 2 M HCl, MeOH; viii.) TsCl, piridin, CH₂Cl₂; ix.) 10 % HCl, MeOH, Δ; x.) 1. XIV-13, NaBH₄, kat. Co(OAc)₂, H₂O, 2. XIV-12a-e, MeOH, H₂O.

18. Táblázat A B₁₂ koenzim és az Ado-(CH₂)_n-Cbl (XIV-1a-e) analogonok 500 MHz ¹H-NMR adatai, 1. rész ^{a,b}

		Kémiai eltolódás (rel. TSP ^c)					
		Ado-Cbl	XIV-1a	XIV-1b	XIV-1c	XIV-1d	XIV-1e
			n = 3	n = 4	n = 5	n = 6	n = 7
<i>Korrin Me</i>							
Me(1 ¹)	<i>br s</i>	0.47	0.480	0.486	0.504	0.502	0.503
Me(2 ¹)	<i>s</i>	1.36	1.364	1.356	1.375	1.376	1.377
Me(5 ¹)	<i>s</i>	2.45	2.439	2.482	2.473	2.474	2.487
Me(7 ¹)	<i>s</i>	1.70	1.773	1.776	1.767	1.760	1.752
Me(12 ¹)	<i>s</i>	0.87	0.841	0.861	0.767	0.813	0.801
Me(12 ¹)	<i>s</i>	1.32	1.364	1.337	1.333	1.338	1.332
Me(15 ¹)	<i>s</i>	2.43	2.367	2.305	2.381	2.344	2.388
Me(17 ¹)	<i>s</i>	1.36	1.175	1.117	1.204	1.223	1.265
<i>Korrin CH</i>							
CH(3)	<i>d</i>	4.10	4.064	4.12	4.11	4.10	4.150
CH(8)	<i>dd</i>	3.29	3.399	3.342	3.396	3.39	3.43
CH(10)	<i>s</i>	5.93	5.938	5.893	5.931	5.956	5.953
CH(13)	<i>dd</i>	2.89	3.033	2.954	3.012	2.960	2.99
CH(18)	<i>dd</i>	2.65	2.64	2.61	2.63	2.64	2.66
CH(19)	<i>d</i>	4.24	4.044	4.07	4.080	4.078	4.073
<i>Korrin oldallánc CH₂ (a = alacsony mező, b = magas mező)</i>							
CH ₂ (2 ¹)	<i>d</i>	2.41	2.35, 2.31	2.36, 2.32	2.39, 2.323	2.40, 2.34	2.41, 2.317
CH ₂ (3 ¹)	<i>m</i>	2.06, 1.96	2.08, 1.98	2.09, 2.00	2.04, 2.00	2.02, 1.99	2.05, 1.97
CH ₂ (3 ²)	<i>ddd</i>	2.50	2.52, 2.45	2.53, 2.45	2.57, 2.51	2.54, 2.50	2.54, 2.48
CH ₂ (7 ¹)	<i>d</i>	2.19, 1.72	2.43, 1.910	2.47, 1.957	2.43, 1.901	2.48, 1.924	2.46, 1.874
CH ₂ (8 ¹)	<i>m</i>	1.75, 0.81	1.84, 0.83	1.83, 0.82	1.82, 0.82	1.80, 0.82	1.79, 0.84
CH ₂ (8 ²)	<i>ddd</i>	1.73, 0.88	1.77, 0.936	1.77, 0.92	1.75, 0.95	1.77, 0.95	1.70, 0.92
CH ₂ (13 ¹)	<i>m</i>	2.22, 2.00	2.06, 2.01	2.02, 1.97	2.10, 2.00	2.10, 2.01	2.10, 2.00
CH ₂ (13 ²)	<i>ddd</i>	2.54	2.61, 2.56	2.53, 2.48	2.53, 2.47	2.54, 2.46	2.54, 2.46
CH ₂ (17 ¹)	<i>ddd</i>	2.45, 2.06	2.44, 2.05	2.40, 2.02	2.43, 2.05	2.42, 2.04	2.48, 2.04
CH ₂ (17 ²)	<i>ddd</i>	1.78	2.42, 1.74	2.35, 1.68	2.40, 1.74	2.40, 1.75	2.43, 1.76
CH ₂ (18 ¹)	<i>dd</i>	2.65	2.66, 2.61	2.61, 2.61	2.67, 2.62	2.65, 2.60	2.68, 2.64
<i>1-Aminopropán-2-ol (Apr; a = alacsony mező, b = magas mező)</i>							
CH ₂ (1)(Apr)	<i>dd</i>	3.54, 3.16	3.54, 3.189	3.54, 3.191	3.54, 3.203	3.53, 3.205	3.53, 3.188
H-C(2)(Apr)	<i>m</i>	4.33	4.353	4.358	4.359	4.36	4.353
Me(3)(Apr)	<i>d</i>	1.21	1.213	1.211	1.210	1.205	1.213

18. Táblázat A B₁₂ koenzim és az Ado-(CH₂)_n-Cbl (XIV-1a-e) analogonok 500 MHz ¹H-NMR adatai, 2. rész ^{a,b}

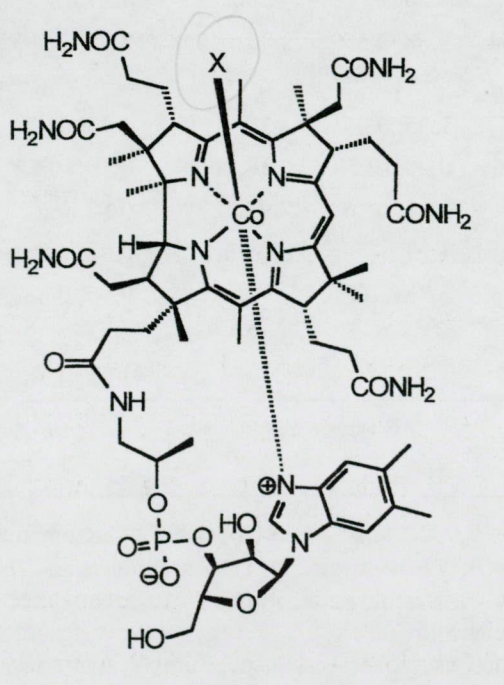
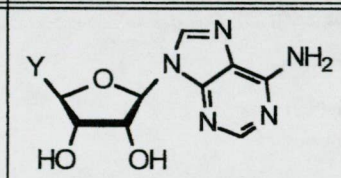
		Kémiai eltolódás (rel. TSP °)					
		Ado-Cbl	XIV-1a	XIV-1b	XIV-1c	XIV-1d	XIV-1e
			<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 7
<i>(Dimetilbenzimidazolil)ribóz (Dbi-Rib)</i>							
H-C(2)(Dbi)	<i>s</i>	6.95	6.929	6.929	6.937	6.932	6.939
H-C(4)(Dbi)	<i>s</i>	6.24	6.228	6.229	6.232	6.231	6.230
H-C(7)(Dbi)	<i>s</i>	7.16	7.169	7.157	7.162	7.159	7.159
Me-C(5), C(6)(Dbi)	<i>s</i>	2.19	2.219	2.215	2.216	2.218	2.213
H-C(1')(Rib)	<i>d</i>	6.26	6.262	6.246	6.254	6.247	6.257
H-C(2')(Rib)	<i>dd</i>	4.23	4.223	4.219	4.227	4.222	4.228
H-C(3')(Rib)	<i>ddd</i>	4.72	4.735	4.726	4.732	4.730	4.730
H-C(4')(Rib)	<i>dt</i>	4.10	4.11	4.10	4.11	4.10	4.110
2H-C(5')(Rib)	<i>dd</i>	3.88, 3.74	3.90, 3.744	3.89, 3.736	3.90, 3.743	3.89, 3.74	3.90, 3.745
<i>Adenozin (Ade-Rib)</i>							
H-C(2)(Ade)	<i>s</i>	8.19	8.267	8.282	8.256	8.285	8.197
H-C(8)(Ade)	<i>s</i>	8.00	8.274	8.396	8.314	8.395	8.337
H-C(1')(Rib)	<i>d</i>	5.56	6.002	6.061	6.050	6.098	6.070
H-C(2')(Rib)	<i>t(dd)</i>	4.54	4.685	4.726	4.696	4.659	4.703
H-C(3')(Rib)	<i>t(dd)</i>	3.74	4.245	4.255	4.361	4.360	4.409
H-C(4')(Rib)	<i>ddd</i>	2.54	4.11	4.167	4.204	4.258	4.275
2H-C(5')(Rib)	<i>dd</i>	1.55, 0.57	3.54, 3.376	3.616, 3.54	3.68, 3.559	3.77, 3.658	3.75, 3.693
<i>Alkil-Co</i>							
CH ₂ (1'')-Co			1.281, 0.49	1.37, 0.47	1.35, 0.35	1.35, 0.50	1.33, 0.42
CH ₂ (2'')			0.32, -0.18	0.35, -0.46	0.20, -0.50	0.10, -0.49	0.10, -0.52
CH ₂ (3'')			3.13, 2.936	1.22, 1.04	0.93, 0.76	0.95, 0.79	0.87, 0.62
CH ₂ (4'')				3.266, 3.17	1.27	0.95	0.92, 0.86
CH ₂ (5'')					3.284, 3.22	1.31	0.96, 0.88
CH ₂ (6'')						3.42	1.34, 1.32
CH ₂ (7'')							3.42, 3.38
<i>Összes nem-cserélhető H</i>							
		81	87 ^d	89	91 ^d	93	95 ^d

^a B₁₂-koenzim (6.5 mg, 0.35 ml 10 mM foszfát-D₂O pufferben, pD= 7.0, 20 °C) ²⁴, Ado-O(CH₂)_n-Cbl analogonok (~ 1-3 mg, 0.5 ml 20 mM foszfát-D₂O pufferben, pH= 7.4, 10 °C); ^b Rövidítések: Apr= 1-aminopropán-2-ol, Dbi= 5,6-dimetilbenzimidazol, Ade= adenin, Rib= ribóz; A XIV-1a-e analogonok minden hozzárendelését a legalább egy analogon esetében a COSY 2D spektrumban megjelenő megfelelő ³J, ⁴J vagy ⁵J keresztcsúcsok igazolták; TSP= trimetilszilil propionát, a 3 értékes jegyre megadott csúcsokat az 1D spektrumból, a 2 értékes jegyre megadottakat (±0.01 ppm) a COSY spektrumból olvastuk le; ^d A pontos integrálással meghatározott összpoton mennyiség.

Az így nyert “poszthomolízis intermedier” analogonok [**Ado**-(CH₂)_n-Cbl, n= 3-7; 33. Ábra] - melyekben változó hosszúságú szénlánc beékelése biztosítja a homolízis utáni intermedierben kialakulóhoz hasonló elrendeződést, azaz a megfelelő Co-C_{5'} távolságot - szerkezetét részletes NMR analízissel bizonyítottuk (**XIV. melléklet**²³, 18. Táblázat).

Az analogonok hozzávetőleges Co-C_{5'} távolságát MM2 módszerrel végzett molekulamechanikai számításokkal becsültük²³. Mind az NMR adatok, mind a molekulamechanikai számítások azt mutatták, hogy a páros-páratlan metilént tartalmazó analogonok között számottevő konformációs különbség van.

Egyszerű, a szubsztrát geometriai méretét alapul vevő becslést adtunk a B₁₂-koenzim függő enzimek “poszthomolízis intermedierjeiben” a Co-C_{5'} távolságra²³, mely szerint a “poszthomolízis intermedierben” nagyobb szubsztrátokon ható enzimek esetében 9-11 Å, míg kisebb szubsztrátokkal működő enzimekben 6-9 Å Co-C_{5'} távolság várható. Az általunk előállított “poszthomolízis intermedier” analogonokkal [**Ado**-(CH₂)_n-Cbl, n= 3-7] enzimkinetikai vizsgálatokat végezve igazolhatjuk e becslés helytállóságát: az enzimkatalizált folyamatot várhatóan az az analogon gátolja a legnagyobb mértékben, amely a legjobban közelít a valós “poszthomolízis intermedier” szerkezetéhez.

	X
	
Ado-Cbl	Y= CH ₂ (B₁₂-koenzim)
Ado-(CH₂)_n-Cbl	Y= (CH ₂) _n OCH ₂ (n= 3-7)
CN-Cbl	CN (B₁₂-vitamin)
Me-Cbl	CH ₃ (metil-kobalamin)
HO-Cbl	OH (hidroxi-kobalamin)
HO-(CH₂)_m-Cbl	HO-(CH ₂) _m (m= 2-5)
(R)-diol-Cbl	(R)- HO-CH ₂ -CH(OH)-CH ₂
(S)-diol-Cbl	(S)- HO-CH ₂ -CH(OH)-CH ₂
HOOC-(CH₂)_x-Cbl	HOOC-(CH ₂) _x (x= 1-6)

33. ábra A megemlített “base-on” B₁₂-származékok szerkezete

3.2.1.1. Mutáz enzimek vizsgálata poszthomolízis intermedier analagonokkal

Az (R)-metilmalonil-CoA \leftrightarrow szukcinil-CoA átrendeződést katalizáló mutáz enzim inhibíciós-kinetika vizsgálata igazolta a nagyobb szubsztrátumon ható enzimekre vonatkozó feltevésünket: ezzel az enzimmal a C₆ [Ado-(CH₂)₆-Cbl, Co-C₅= ~10Å] analagon bizonyult a legerősebb inhibítornak (XV. melléklet ²⁵, 19. Táblázat) ²⁶.

19. Táblázat A mutáz enzimek által katalizált reakciók inhibíciója poszthomolízis állapot analagonokkal [Ado-(CH₂)_n-Cbl, n= 3-7]

	Metilmalonil-CoA mutáz		2-Metilénglutarát mutáz		Glutamát mutáz	
	K _i (μM)	K _i /K _m (%)	K _i (μM)	K _i /K _m (%)	K _i (μM)	K _i /K _m (%)
Ado-Cbl*	0,062*		0,152*		0,190*	
HO-Cbl	>25	>40000	>25	>15000	>25	>15000
CN-Cbl	>25	>40000	>25	>15000	>25	>15000
PCC	>25	>40000	4,500	3000	>25	>15000
Ado-(CH ₂) ₃ -Cbl	2,480	1042	0,113	74	0,081	43
Ado-(CH ₂) ₄ -Cbl	1,450	609	0,085	56	0,255	134
Ado-(CH ₂) ₅ -Cbl	1,130	475	0,130	86	0,133	70
Ado-(CH ₂) ₆ -Cbl	0,770	324	0,104	68	0,081	43
Ado-(CH ₂) ₇ -Cbl	2,100	882	0,108	71	0,150	79

* Az adat a B₁₂-koenzimmal meghatározott látszólagos Michaelis állandó (K_m)

A glutamát mutáz és 2-metilénglutarát mutáz ²⁷ esetében nem találtunk ilyen erőteljes méretfüggést az inhibíció erősségére, az összes analagon gyakorlatilag egyforma erős inhibitor. Az erős inhibícióhoz mindhárom mutáz esetében szükséges a két egység - a korrin gyűrűrendszer és az adenosil csoportban végződő β-ligandum - egyidejű jelenléte. Ezt bizonyítja, hogy a kisméretű Coβ-ligandumot tartalmazó korrinoidok (HO-Cbl, CN-Cbl, PCC) gyakorlatilag nem inhibitorok. A metilmalonil-CoA mutáz enzimmal az adenosin önmagában vagy hidroxikobalaminnal (HO-Cbl) együtt ugyancsak nem inhibitor ²⁵.

Említésre méltó, hogy míg a metilmalonil-CoA mutáz esetében még a legerősebb inhibitorral is a K_i/K_m arány jóval egy felett van (ez a B₁₂-koenzimmal gyengébb kötődést jelent), addig a másik két mutáz esetében a "poszthomolízis intermedier" analagonok a koenzimmal erősebben kötődnek (a K_i/K_m arány kisebb egynél).

3.2.1.2. Elimináz enzimek vizsgálata poszthomolízis intermedier analogonokkal

A kisebb szubsztrátokat (glicerín, 1,2-propándiol) igénylő glicerín dehidratáz (GDH) és diol dehidratáz (DDH) enzimek esetében a C_3 - C_5 analogonok [$\text{Ado}-(\text{CH}_2)_n\text{-Cbl}$, $n= 3-5$; $\text{Co}-C_5 \sim 6-9\text{\AA}$] bizonyultak a legerősebb inhibitoroknak ²⁶ (XVI. melléklet ²⁸, 20. Táblázat), ami összhangban áll előzetes becslésünkkel.

20. Táblázat Az elimináz enzimek által katalizált reakciók inhibíciója poszthomolízis állapot analogonokkal [$\text{Ado}-(\text{CH}_2)_n\text{-Cbl}$, $n= 3-7$]

	Glicerín dehidratáz		Diol dehidratáz		Etanolamin ammónia liáz	
	K_i (nM)	K_i/K_m (%)	K_i (μM)	K_i/K_m (%)	K_i (nM)	K_i/K_m (%)
Ado-Cbl*	12,6*		0,75*		28,8*	
Ado-(CH₂)₃-Cbl	10,5	83	0,77	103	15,3	53
Ado-(CH₂)₄-Cbl	9,7	77	0,86	115	23,9	83
Ado-(CH₂)₅-Cbl	5,9	47	0,50	67	9,0	31
Ado-(CH₂)₆-Cbl	15,1	120	0,83	111	8,6	30
Ado-(CH₂)₇-Cbl	11,7	93	0,63	84	4,8	17

* Az adat a B₁₂-koenzimmel meghatározott látszólagos Michaelis állandó (K_m)

A diol dehidratáz és glicerín dehidratáz enzimek esetében az inhibíciós erősség hullámzó változása - főleg a C_4 - C_7 analogonok esetében - figyelhető meg. Magyarázat lehet, hogy ezen enzimek érzékenyek a $\text{Co}-\beta$ -ligandumnak a kobalt atomot és az adenosil részt összekötő lánc metilénsoportjainak páros/páratlan számától függő konformációjára. A poszthomolízis állapot analogonok [$\text{Ado}-(\text{CH}_2)_n\text{-Cbl}$, $n= 3-7$] esetében hasonló, lánctagszámtól függő alternáló tulajdonságokat molekulamechanikai vizsgálatokkal és ¹H-NMR segítségével is találtunk ²⁵.

Érdekes módon az ugyancsak elimináz jellegű etanolamin ammónia liáz (EAL) esetében a leghosszabb analogon [$\text{Ado}-(\text{CH}_2)_7\text{-Cbl}$, $\text{Co}-C_5 \sim 12\text{\AA}$] bizonyult a legerősebb inhibitornak, és az inhibíció nem mutatta a fenti erős konformációfüggést ^{29,30}. Ezek az adatok jelzik, hogy az etanolamin ammónia liáz esetében a reaktív komplexben a korrin gyűrű és az adenosil rész valószínűleg nagymértékben elkülönül.

3.2.1.3. Ribonukleotid trifoszfát reduktáz vizsgálata poszthomolízis intermedier analógokkal

A ribonukleotid trifoszfát reduktáz (RTPR) enzim - amely szintén "base-on" módon köti a B₁₂-koenzimet - esetében a "poszthomolízis intermedier" analógok [Ado-(CH₂)_n-Cbl, n= 3-7] inhibíciós viselkedése hasonlónak bizonyult (XVII. melléklet ³¹, 21. Táblázat), mint a glicerín és diol dehidratáz enzimek esetében (3.2.1.2. Fejezet). Ezzel az enzimmal a legerősebb inhibíciót a közepes tagszámú analógonnal [Ado-(CH₂)₅-Cbl] tapasztaltuk, és ezzel az enzimmal is lánctagszám / konformáció-függő alternáló inhibíciót észleltünk.

21. Táblázat A ribonukleotid trifoszfát reduktáz enzim inhibíciója poszthomolízis intermedierekkel [Ado-(CH₂)_n-Cbl, n= 3-7]

<i>Ribonukleotid trifoszfát reduktáz</i>			
	<i>K_i</i> (μM)	<i>K_i/K_m</i>	<i>Inhibíció típusa</i>
Ado-Cbl*	1,5*		
Ado-(CH ₂) ₃ -Cbl	55,8	37,2	kompetitív
Ado-(CH ₂) ₄ -Cbl	18,9	12,6	kompetitív
Ado-(CH ₂) ₅ -Cbl	7,7	5,1	kompetitív
Ado-(CH ₂) ₆ -Cbl	24,6	16,4	kompetitív
Ado-(CH ₂) ₇ -Cbl	12,8	8,5	kompetitív
Adenilpentil-Cbl	1,3	0,9	kevert
Kob(II)alamin	20,8	13,9	kompetitív
Kob(II)alamin + adenzin	14,3	9,5	kompetitív
CN-Cbl	42,6	28,4	kompetitív

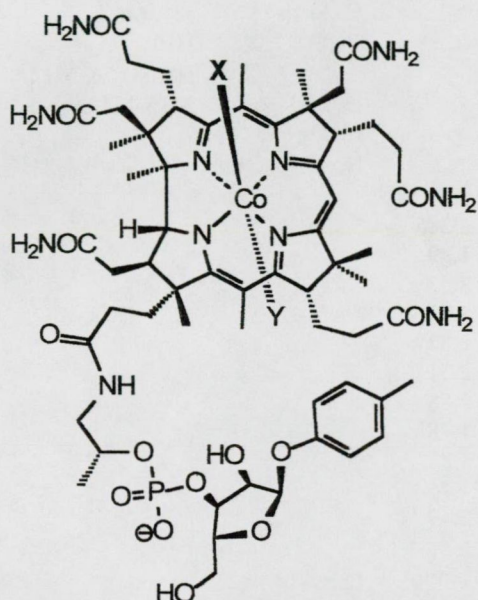
* Az adat a B₁₂-koenzimmel meghatározott látszólagos Michaelis állandó (*K_m*)

A cianokobalaminnal (CN-Cbl), kob(II)alaminnal és a kob(II)alamin + adenzin együttes adagolásával tapasztalt kompetitív inhibíció megerősítik, hogy a jelentős inhibícióhoz mind a korrin, mind az adenzil kötőhely együttes gátlása szükséges.

Az adenilpentil-kobalamin igen erős kevert inhibíciója azt valószínűsíti, hogy ez a származék az ATP szubsztrát és a korrin kötőhely együttes gátlásával hat (ld. szubsztrát-korrin típusú inhibitorok, 3.2.3. Fejezet).

A B₁₂-koenzim "base-off" analogonját (Ado-PCC) a *Sporomusa ovata* mikroorganizmus által termelt "base-off" korrinoidból (PCC, 35. Ábra) 5-klóradenozinnal történő redukzív alkilezéssel állítottuk elő. A preparatív HPLC segítségével tisztított egységes terméket teljes NMR asszignációjával (22. Táblázat³²) kétséget kizáróan azonosítottuk.

Enzimkinetikai vizsgálatainkhoz az alapvegyület (PCC) redukzív alkilezésével további analogonokat is szintetizáltunk (35. Ábra).



(Y= OH)	X
Ado-PCC	
PCC	CN
(R)-diol-PCC	(R)- HO-CH ₂ -CH(OH)-CH ₂
(S)-diol-PCC	(S)- HO-CH ₂ -CH(OH)-CH ₂
HOOC-C _x -Cbl	HOOC-(CH ₂) _x (x= 3, 5)

35. ábra A megemlített és előállított "base-off" B₁₂-származékok szerkezete

Az enzimekhez a koenzim két módon kötődhet (1.2.2.2. Fejezet, 6. Ábra). Az ún. "base-off" kötődés esetén a nukleotid oldallánc 5,6-dimetilbenzimidazolil egységének nitrogénjét az enzim egyik hisztidinje helyettesíti, és kötődéskor a nukleotid oldallánc a korrin gyűrű alól kihajlik, mint az a 34. Ábrán a metionin szintázhoz kötött metilkobalamin esetében látható. Az ún. "base-on" enzimekkel még az apoenzimhez kötött állapotban is az 5,6-dimetilbenzimidazolil csoport nitrogénje koordinálja az α oldalról a korrin gyűrű kobalt atomját. A homolízishez szükséges bázikus α -ligandum így tehát a "base-off" enzimek esetében az enzim hisztidinjének nitrogénje, míg a "base-on" enzimek esetében a koenzim nukleotid oldallánc 5,6-dimetilbenzimidazolil részének nitrogénje.

22. Táblázat A B₁₂-koenzim formái és a "base-off" analogon (Ado-PCC) ¹H-NMR adatai

Asszignáció ^a	Jel	CoB ₁₂		CoB ₁₂		Ado-PCC	
		"base-off"	"base-on"	"base-off"	"base-on"	J csatolás	NOE ^c
		(ppm)*	(ppm)*	(ppm)*	(ppm)*	(Hz) ^b	
Korrin CH₃							
M1	s	0.81	0.47	0.704			M2, H3
M2	s	1.48	1.36	1.405			M1, M5, H3
M5	s	2.43	1.45	2.389			M2, H3, M7, 7 ¹ a,b
M7	s	1.82	1.70	1.819			M5
M12β	s	1.00	0.87	0.845			M12α, M15, H13
M12α	s	1.67	1.32	1.585			M12β
M15	s	2.46	2.43	2.336			H13, M12, M17
M17	s	1.40	1.36	1.141			M15, H19
Korrin CH							
H3	dd	4.23	4.10	4.217		3 ¹ a,b: 2, 9.5	M2, M5
H8	dd	3.73	3.29	3.784		8 ¹ a,b: 8.7, 4.5	H10
H10	s	6.97	5.93	6.994			H8, M12β, M12α
H13	dd	3.43	2.89	3.308		13 ¹ a,b: 4, 6	M15, M12β
H18	ddd	2.85	2.65	2.787		18 ¹ a,b: 9, 3	
H19	d	4.70	4.24	4.653		18: 10.7	M17, 2 ¹ a,b
Korrin CH₂							
2 ¹ a,b	d	2.60	2.46	2.41	2.66	2.285	2 ¹ a,b: -13.5
3 ¹ a,b	m	2.11	1.97	2.06	1.96	1.99	1.89
3 ² a,b	ddd	2.55		2.50		2.50	2.43
7 ¹ a,b	d	2.61	2.14	2.19	1.72	2.275	1.73
8 ¹ a,b	m	2.21	1.75	1.75	0.81	2.25	1.82
8 ² a,b	ddd	2.35	2.35	1.73	0.88	2.43	2.31
13 ¹ a,b	m	2.21	1.92	2.22	2.00	2.18	1.88
13 ² a,b	ddd	2.21	1.86	2.54		2.15	1.78
17 ¹ a,b	ddd	2.51	1.85	2.45	2.06	2.42	1.83
17 ² a,b	ddd	2.31	1.85	2.45	1.78	2.36	1.76
18 ¹ a,b	dd	2.78		2.65		2.68	2.49
Aminopropán-2-ol oldallánc							
CH ₂ (Apr-1a,b)	dd	3.38	3.27	3.54	3.16	3.470	3.395
CH (Apr-2)	dddq	4.36		4.33		4.42	
CH ₃ (Apr-3)	d	1.23		1.21		1.238	
Nukleotid oldallánc ribóz							
1'	d	6.56		6.26		5.664	
2'	dd	4.97		4.23		4.331	
3'	dd	4.83		4.72		4.551	
4'	dd	4.79		4.10		4.38	
5'a,b	m	3.94	3.84	3.88	3.74	3.72	3.70
p-Krezil							
Cr2,6	d					6.873	
Cr3,5	d					7.026	
Cr4-Me	s					2.128	
Adenozil							
H2	s	8.43		8.19		8.233	
H8	s	8.21		8.00		8.037	
1'	d	5.61		5.56		5.615	
2'	dd	4.34		4.54		4.40	
3'	dd	3.90		3.74		3.754	
4'	d	1.98		2.54		2.002	
5'a,b	dd, dd	1.46	0.38	1.55	0.57	0.602	0.312

* 500 MHz-en mért ¹H-NMR kémiai eltolódások; ^a Asszignációs nomenklatura [23] szerint; A B₁₂-koenzim két formájának kémiai eltolódásai [24] és [34] szerint; ^b Kiértékelhető J csatoló partnerek és hozzárendelhető állandók; ^c NOESY keresztcsúcsot eredményező partnerek, a vastag szedés erős effektust jelöl.

A kötődési módot több enzim esetében meg lehetett határozni röntgenkristallográfia, ESR spektroszkópia, ill. genetikai szekvenciaanalógia alapján. E módszerek közé illeszkednek az előállított "base-off" koenzim analogon (Ado-PCC) segítségével végezhető enzimkinetikai vizsgálatok: a vegyület a "base-off" kötősmódú enzimekkel hatásos koenzim, míg a "base-on" enzimekkel koenzimként inaktív, ám gyenge inhibitor.

A fent említettek és az általunk alább részletezett eredmények alapján egybecsengően a nagyobb, apolárisabb vándorló csoportok átrendeződését katalizáló mutázok "base-off", míg a kisebb, poláris csoportok átrendeződését katalizáló eliminázok "base-on" kötősmódú enzimeknek bizonyultak.

3.2.2.1. Mutáz enzimek vizsgálata a B₁₂-koenzim "base-off" analogonjával

Ez a "base-off" koenzim analogon (Ado-PCC) enzimkinetikai vizsgálataink szerint a természetesnél is jobb koenzimként viselkedett a (2R)-metilmalonil-CoA mutázzal (XVIII. melléklet ³²), valamint a glutamát és 2-metilénlgutarát mutázokkal (XIX. melléklet ³⁵) szemben, megerősítve ezen enzimek más módszerek ("base-off" B₁₂-kötőhely szekvenciaminta, ESR, röntgenkristallográfia) által is igazolt "base-off" kötősmódját. A metilmalonil-CoA és 2-metilénlgutarát mutázok esetében az Ado-PCC természetesnél erősebb koenzim-aktivitása azzal magyarázható, hogy ennek a kötődése során nem szükséges az az energiamennyiség, amely a normál koenzim "base-off" kötődése esetén a dimetilbenzimidazol nitrogénje és a kobalt atom közti koordináció megszűnéséhez kell.

23. Táblázat A "base-off" koenzim analogon (Ado-PCC) enzimkinetikai adatai (2R)-metilmalonil-CoA, glutamát és 2-metilénlgutarát mutázokkal

Enzim	Ado-Cbl K_m^a [nM]	Ado-PCC $K_m'^a$ [nM]
(R)-Metilmalonil-CoA mutáz ^b	354±87	64±21
Glutamát mutáz ^c	100±20	200±20*
2-Metilénlgutarát mutáz ^d	54±4	10±1

^a A látszólagos Michaelis-Menten konstansokat a [32 és 35] referenciák szerint határoztuk meg;

^b *Propionibacterium shermanii* mikroorganizmusból izolált enzim ($V_{max} = 23 \pm 3$ nmol/min B₁₂-koenzimmel);

^c *Escherichia coli* segítségével túltermeltetett *Clostridium cochlearium* enzim ($V_{max} = 3760 \pm 120$ nmol/min B₁₂-koenzimmel); * Magas koncentrációknál (>300 nM) az Ado-PCC enyhe inhibitor; ^d *Escherichia coli* segítségével túltermeltetett *Clostridium barkeri* enzim ($V_{max} = 129 \pm 7$ nmol/min B₁₂-koenzimmel).

3.2.2.2. Elimináz enzimek vizsgálata a B₁₂-koenzim "base-off" analogonjával

A "base-off" B₁₂-koenzim analogont (Ado-PCC, 34. Ábra) felhasználtuk három további elimináz enzim kötésmódjának tanulmányozására is (24. Táblázat, XVIII. melléklet³², XIX. melléklet³⁵). Míg ez az analogon (Ado-PCC) aktív koenzimként működött a "base-off" koenzim-kötésmódú mutázokkal, egyáltalán nem mutatott koenzim aktivitást és mérsékelt inhibítornak bizonyult az etanolamin ammónia liáz, glicerín dehidratáz és propándiol dehidratáz enzimekkel szemben, alátámasztva ezen elimináz enzimek "base-on" jellegű koenzim-kötésmódját.

24. Táblázat A "base-off" koenzim analogon (Ado-PCC) kinetikai adatai glicerín dehidratáz, diol dehidratáz és etanolamin ammónia liáz enzimekkel

Enzim	Ado-Cbl K_m^a [nM]	Ado-PCC K_i^b [nM]
Glicerín dehidratáz ^c	14±3	160±37
Diol dehidratáz ^d	750±120	9200±1700
Etanolamin ammónia liáz ^e	30±6	25±6

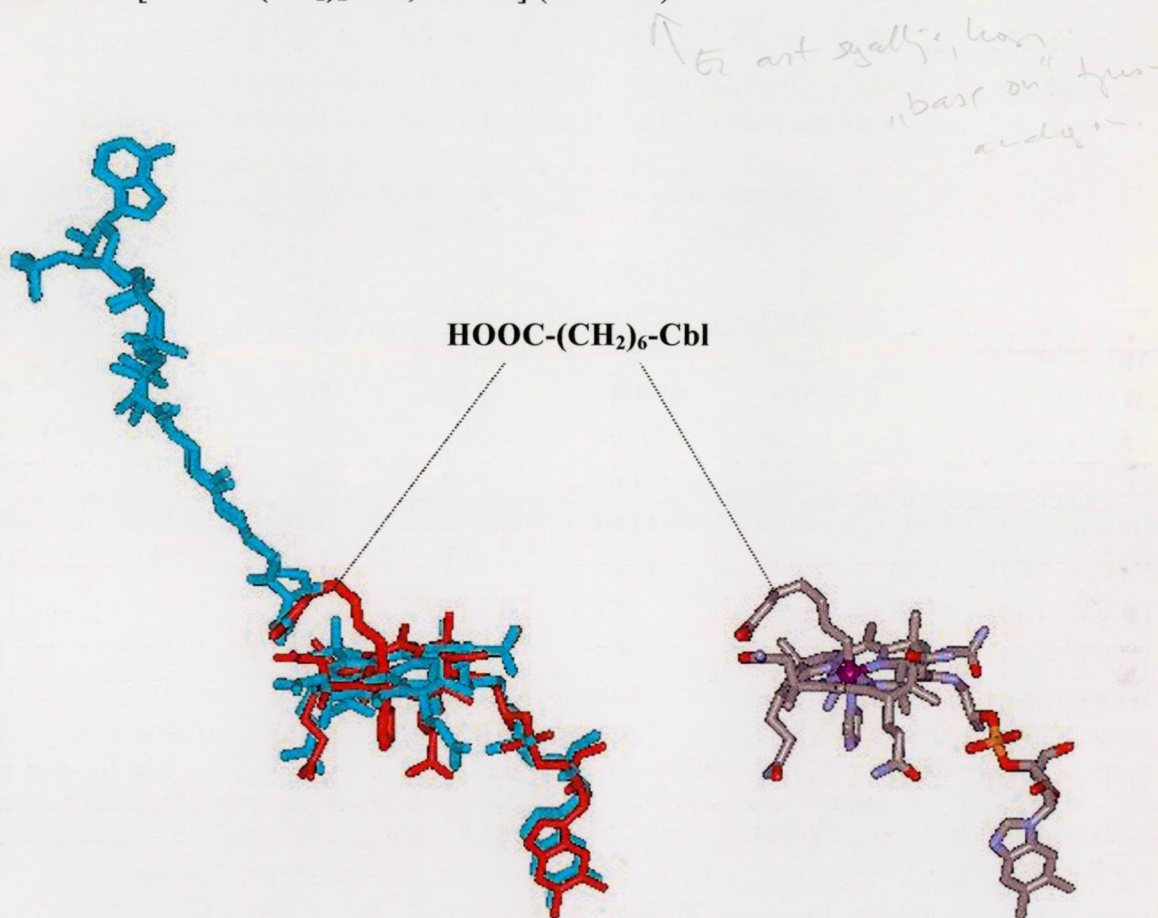
* Koenzim aktivitást a vizsgált enzimekkel 25 µM koncentrációig nem tapasztaltunk; ^a A látszólagos Michaelis-Menten konstansokat (K_m) a [32 és 35] referenciák szerint határoztuk meg; ^b A látszólagos inhibíciós állandókat (K_i) az ún. "parallel" módszer szerint [25] határoztuk meg; ^c *Esherichia coli* segítségével túltermeltetett *Citrobacter freundii* enzim ($V_{max} = 48±4$ nmol/min B₁₂-koenzimmal); ^d *Esherichia coli* segítségével túltermeltetett *Salmonella typhimurium* enzim ($V_{max} = 51±6$ nmol/min B₁₂-koenzimmal); ^e *Esherichia coli* segítségével túltermeltetett *Salmonella typhimurium* enzim ($V_{max} = 35±3$ nmol/min B₁₂-koenzimmal).

3.2.3. Szubsztrát-korrin típusú B₁₂-koenzim analogonok

A glicerín és diol dehidratáz enzimekkel végzett kinetikai vizsgálatok során érdekes eredményeket tapasztaltunk B_{12a}-vitamin (HO-Cbl) és B₁₂-vitamin (CN-Cbl) inhibícióját vizsgálva²⁸: a hasonló méretű X ligandumokat tartalmazó vegyületek közül a B_{12a}-vitamin (HO-Cbl) sokkal erősebb (a B₁₂ koenzimmal összemérhető kötődési erősségű) inhibítornak bizonyult, amit csak egy, a Co közelében található, erősen hidrofíli szubsztrát kötőhelyhez való kölcsönhatással tudunk értelmezni²⁸. Ez indított bennünket szubsztrát-korrin jellegű analogonok előállítására és tesztelésére, melyekkel a szubsztrát kötőhelyre vonatkozó információk nyerhetők.

3.2.3.1. Mutáz enzimek vizsgálata szubsztrát-korrin inhibitorokkal

Az 1.2.2.2. fejezetben bemutatott 3. Táblázatból látható, hogy a mutáz jellegű enzimek esetében a szubsztrátok közös sajátossága legalább egy karbonsav funkciót jelenléte. Ennek megfelelően szubsztrát-korrin típusú B₁₂-koenzim inhibitorok előállításához a korrin gyűrű központi kobaltjához β -ligandumaként különböző hosszúságú ω -karboxialkil csoportokat terveztünk kötni [HOOC-(CH₂)_x-Cbl, X= 1-6] (33. Ábra).



36. Ábra A metilmalonil-CoA mutáz - szubsztrát röntgenszerkezet felhasználásával modellezett HOOC-(CH₂)₆-Cbl analagon

A tervezett vegyületsor inhibíciós sajátosságainak előrejelzéséhez a metilmalonil-CoA mutáz - B₁₂-koenzim - szubsztrát terner komplex kristály-szerkezetének (PDB: 4REQ)³⁶ felhasználásával számítógépes módszerekkel modelleztük a legjobban illeszkedő szubsztrát-korrin típusú analagon [HOOC-(CH₂)₆-Cbl] térszerkezetét³⁷.

A számítógépes előtanulmányok után elkészítettük a mutázok esetében várhatóan szubsztrát-korrin típusú inhibítorként viselkedő vegyületsort $[\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x\text{-Cbl}]$, $X=1-6$] (33. Ábra) és a sor két "base-off" analogonját $[\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x\text{-PCC}]$, $X=3,5$] (34. Ábra). Az előállított inhibitorokkal a metilmalonil-CoA mutáz, glutamát mutáz valamint a 2-metilénglutarát mutáz enzimeket felhasználva kinetikai vizsgálatokat végeztünk (25. Táblázat ³⁸).

25. Táblázat A mutáz enzimek által katalizált reakciók inhibíciója szubsztrát-korrin típusú inhibitorokkal $[\text{Ado}-(\text{CH}_2)_x\text{-Cbl}]$, $x=1-6$; $[\text{Ado}-(\text{CH}_2)_x\text{-PCC}]$, $x=3, 5$

	Metilmalonil-CoA mutáz		2-Metilénglutarát mutáz		Glutamát mutáz	
	K_i^a (μM)	K_i/K_m (%)	K_i^a (μM)	K_i/K_m (%)	K_i^a (μM)	K_i/K_m (%)
Ado-Cbl*	0,062*		0,152*		0,190*	
HO-Cbl	>25	>40000	>25	>15000	>25	>15000
CN-Cbl	>25	>40000	>25	>15000	>25	>15000
PCC	>25	>40000	4,500	3000	>25	>15000
HOOC-(CH₂)-Cbl	0,769	1240	0,544	358	0,289	152
HOOC-(CH₂)₂-Cbl	0,943	1521	0,253	166	0,293	154
HOOC-(CH₂)₃-Cbl	0,361	582	0,160	105	0,225	118
HOOC-(CH₂)₄-Cbl	0,428	690	0,195	128	0,095	50
HOOC-(CH₂)₅-Cbl	0,402	648	0,210	138	0,274	144
HOOC-(CH₂)₆-Cbl	0,127	205	0,054	36	0,066	35
HOOC-(CH₂)₃-PCC	0,048	77	0,015	10	0,327	172
HOOC-(CH₂)₅-PCC	0,053	85	0,035	23	0,551	290

^a A látszólagos inhibíciós állandókat (K_i) az ún. "parallel" módszer szerint [25] határoztuk meg; * A B₁₂-koenzimmel meghatározott látszólagos Michaelis-Menten állandó (K_m), melyet a [32 és 35] hivatkozások szerint határoztuk meg.

Az (*R*)-metilmalonil-CoA mutáz enzim inhibíciós-kinetika vizsgálata igazolta a számítógépes modellezésen alapuló feltevésünket: az ω -karboxialkil-kobalamin sorból ezzel az enzimmel a C₆ $[\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_6\text{-Cbl}]$ analogon bizonyult a legerősebb inhibítornak.

A glutamát mutáz és 2-metilénglutarát mutáz esetében nem találtunk ilyen egyértelmű méretfüggést az inhibíció erősségére. A kobalamin sorban $[\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x\text{-Cbl}]$, $x=1-6$], ezen enzimekkel két látszólagos minimum - a glutamát mutázzal a 4 és 6, míg a 2-metilénglutarát mutázzal a 3 és 6 tagszámú láncot tartalmazó analogon - észlelhető. Ez összhangban áll azzal, hogy ezen enzimek szubsztrátjaiban két, a szubsztrát kötődésben vélhetően fontos szerepet játszó karboxilcsoport található.

Figyelembevétel az enzim korrin-kötésmódját, nem meglepő, hogy a "base-off" analogonok $[\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_x\text{-PCC}]$, $x=3$ és 5] a kobalamin analogonoknál még erősebb inhibíciót mutatnak. Az erős inhibícióhoz mindhárom mutáz esetében szükséges a két egység - a korrin gyűrűrendszer és az karboxilcsoportban végződő β -ligandum - egyidejű jelenléte.

3.2.3.2. Elimináz enzimek vizsgálata szubsztrát-korrin inhibítorokkal

A megfelelő halogenidekből és hidroxikobalaminból (HO-Cbl) a bevált redukáló alkilezési módszerrel elkészítettük a β -ligandumaként hidroxialkil csoportokat tartalmazó, az elimináz enzimekben várhatóan szubsztrát-korrin kötőhely együttes gátlására képes inhibítorokat $[\text{HO}-(\text{CH}_2)_m\text{-Cbl}]$, $m=2-5$; (S)- ill. (R)-Diol-Cbl] (33. Ábra) illetve ezek "base-off" analogonjait [(S)- ill. (R)-Diol-PCC] (34. Ábra) (XX. melléklet ³⁹).

E vegyületek konformációanalízissel segített ¹H-NMR szerkezetmeghatározása után enzimkinetikai vizsgálatokat végeztünk glicerinnal dehidratáz és diol dehidratáz enzimekkel ³⁹ (26. Táblázat). Az etanolamin ammónia liázzal várhatóan szubsztrát-korrin kötőhely együttes gátlására képes inhibítorokként a $[\text{HO}-(\text{CH}_2)_m\text{-Cbl}]$, $m=2-5$] inhibítor sort és a 3-aminopropil-kobalamin $[\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3\text{-Cbl}]$ vizsgáltuk ²⁹ (26. Táblázat).

26. Táblázat Az elimináz enzimek vizsgálata szubsztrát-korrin típusú inhibítorokkal $[\text{Co}\beta\text{-X})\text{-Cbl}]$ (XX-1a-d; XX-2a,b) ill. $(\text{Co}\beta\text{-X})\text{-PCC}$ (XX-3a,b)]

	Glicerinnal dehidratáz		Diol dehidratáz		Etanolamin ammónia liáz	
	K_i^a (nM)	K/K_m (%)	K_i^a (nM)	K/K_m (%)	K_i^a (nM)	K/K_m (%)
Ado-Cbl*	12,6*		770*		28,8*	
HO-Cbl	8,6	68	680	88	12,7	44
PCC	9960	79000	>25000	3247	152,0	528
CN-Cbl	21,6	171	1420	184	19,2	67
HO-(CH ₂) ₂ -Cbl	13,4	106	770	100	25,7	89
HO-(CH ₂) ₃ -Cbl	13,3	106	760	99	17,1	59
HO-(CH ₂) ₄ -Cbl	17,0	135	1060	138	9,3	32
HO-(CH ₂) ₅ -Cbl	25,2	200	950	123	5,4	19
(S)-Diol-Cbl	14,8	117	1080	140		
(R)-Diol-Cbl	17,6	140	1250	162		
(S)-Diol-PCC	57,0	452	5100	662		
(R)-Diol-PCC	348	2762	6400	831		
H ₂ N-(CH ₂) ₃ -Cbl					13,3	46

^a A látszólagos inhibíciós állandókat (K_i) az ún. "parallel" módszer szerint [25] határoztuk meg; * A B₁₂-koenzimmel meghatározott látszólagos Michaelis-Menten állandó (K_m), melyet a [32 és 35] hivatkozások szerint határoztuk meg.

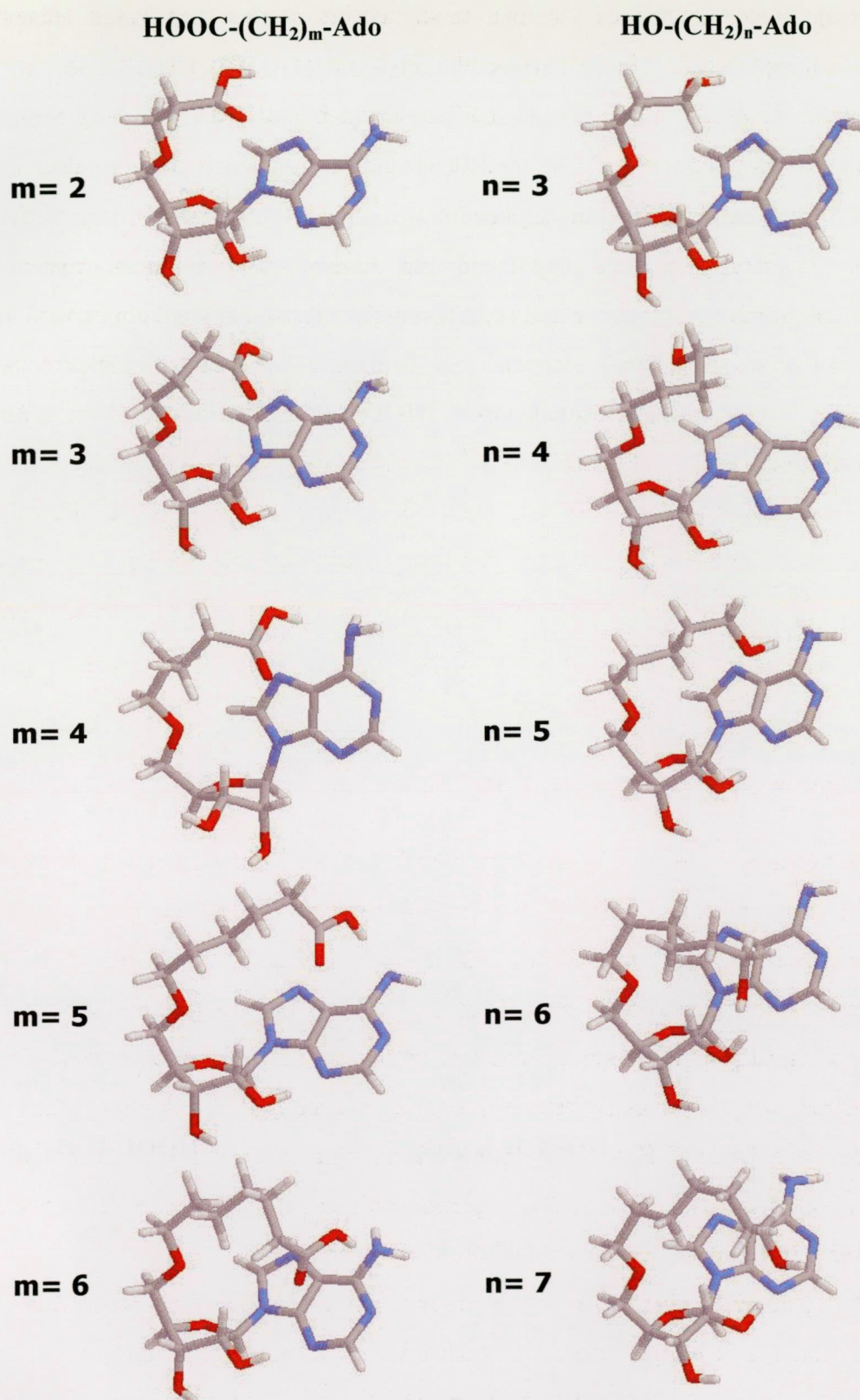
Várakozásainknak megfelelően a glicerín dehidratáz és diol dehidratáz enzimekkel a "base-on" jellegű, rövid láncú vegyületek $[\text{HO}-(\text{CH}_2)_m\text{-Cbl}]$, $m=2-3$] bizonyultak a legerősebb inhibítoroknak, a "base-on" jellegű hosszabb láncú, ill. diol vegyületek $[\text{HO}-(\text{CH}_2)_m\text{-Cbl}]$, $m=4-5$; (*S*)- ill. (*R*)-Diol-Cbl] valamivel gyengébb, ám jelentős inhibíciót mutattak. A "base-off" jellegű diol vegyületek [(*S*)- ill. (*R*)-Diol-PCC] gyenge inhibítorok voltak, míg a β -ligandumként hidroxycsoportot tartalmazó "base-off" alapkorrinoid (PCC) egyáltalán nem mutatott inhibíciót. E tények összhangban vannak egy erősen hidrofil kötőhely jelenlétével, illetve a koenzim e két enzimnél már bizonyított "base-on" kötődési módjával.

Etanolamin ammónia liáz esetében - összhangban a "poszthomolízis intermedier" analogonokkal nyert inhibíciós adatokkal^{29, 30} - ugyancsak a leghosszabb láncú szubsztrát-korrin inhibítor $[\text{HO}-(\text{CH}_2)_5\text{-Cbl}]$ bizonyult a legerősebbnek (26. Táblázat). Ez a 3.2.1.2. Fejezetben leírtakkal összevágóan független módon megerősíti, hogy az EAL enzim esetében a reaktív enzim-koenzim-szubsztrát komplexben az adenzin és a reagáló szubsztrát vélhetően meglehetősen eltávolodik a korrin központi kobaltjától.

3.2.4. B₁₂-függő enzimek szubsztrát-adenozil típusú inhibítorai

A 3.2.1. fejezetben tárgyalt B₁₂-koenzim poszthomolízis intermedier analogonok adatokat szolgáltatottak az adenzil kötőhely és a korrin gyűrű viszonylagos helyzetéről, és a 3.2.3. fejezetben bemutatott szubsztrát-korrin típusú inhibítorok alkalmasnak bizonyultak a B₁₂-függő enzimek szubsztrát kötőhelyének tanulmányozására. Eredeti terveink közt szerepelt e vegyületek felhasználása fehérje-krisztallográfiai tanulmányokban, azonban a metilmalonil-CoA mutáz enzimmel, szukcinil-CoA szubsztráttal és a legerősebb inhibíciót mutató poszthomolízis állapot analogonnal $[\text{Ado}-(\text{CH}_2)_6\text{-Cbl}]$ végzett krisztallográfiai kísérletek⁴⁰ azt mutatták, hogy a fotolabilis kobalt-szén kötés röntgen besugárzás során hasad, ami gátja e két vegyületcsalád ilyen célú felhasználásának.

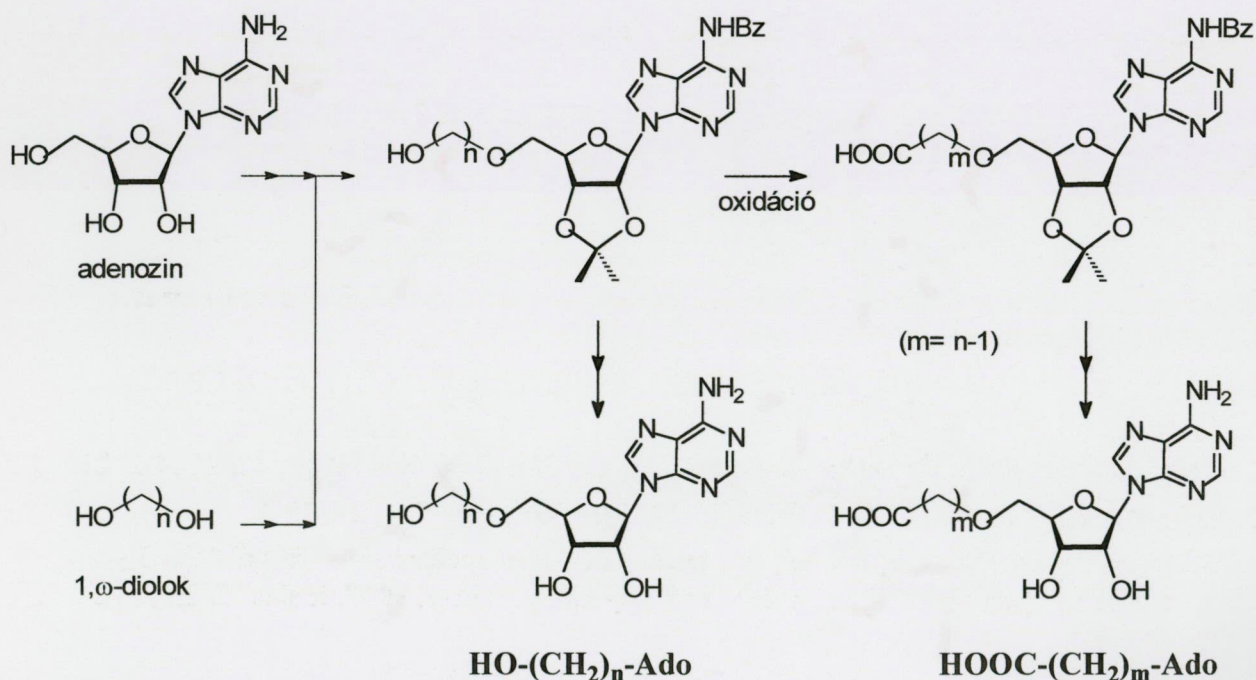
Ezeket figyelembe véve olyan analogonokat terveztünk, melyek vélhetően képesek egyszerre kötődni a B₁₂-függő enzimek szubsztrát illetve adenzil kötőhelyeihez, így ezen kötőhelyek viszonylagos elrendeződéséről szolgáltathatnak adatokat. Ilyen - a fotolabilis kobalt-szén kötetést nem tartalmazó - vegyületek az elimináz enzimek esetében az 5'-O-(ω -hidroxialkil)adenozin $[\text{HO}-(\text{CH}_2)_n\text{-Ado}]$, $n=3-7$], a mutáz enzimek esetében az 5'-O-(ω -karboxialkil)adenozin $[\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m\text{-Ado}]$, $m=2-6$] származékok (37. Ábra).



37. Ábra A szubsztrát-adenozil típusú vegyületek minimum energiájú konformációi

A metilmalonil-CoA mutáz és glutamát mutáz ismert röntgenszerkezeteit felhasználva számításokat végeztünk az 5'-O-(ω -karboxialkil)adenozin [$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m\text{-Ado}$, $m=2-6$] vegyületekkel ^{41, 42}. A dokkolási vizsgálatok szerint metilmalonil-CoA mutáz esetében a legjobban a illeszkedő vegyületek az 5 ill. 6 metilénsoportot tartalmazó analogonok.

A számítógépes modellezés után nekikezdünk a tervezett szubsztrát-korin vegyületek előállításának (38. Ábra). A jelen állapotában csak vázlatosan szemléltetett szintézisek ⁴³ nagyrészt a 3.2.1 fejezetben bemutatott, a poszthomolízis intermedier analogonok előállítására felhasznált módszeren (32. Ábra) alapulnak. A bemutatott elveknek megfelelő eljárással elkészítettük az 5'-O-(6-karboxihexil)adenozint [$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_6\text{-Ado}$] és folyik a további vegyületek szintézise.



38. Ábra A szubsztrát-adenozil típusú inhibítorok szintézis-vázlata

IRODALOM A 3. FEJEZETHEZ

1. Wu, P. C.; Kroening, T. A.; White, P. J.; Kendrick, K. E., *J. Bacteriol.*, **1992**, *174*, 1647.
2. Hanson, K. R.; Havir, E. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *141*, 1.
3. Hanson, K. R.; Havir, E. A., *Biochemistry* **1973**, *12*, 1583.
4. Havir, E. A.; Reid, P. D.; March, H. V., *Plant Physiol.* **1971**, *48*, 130.
5. Schuster, B.; Rétey, J., *FEBS Lett.* **1994**, *349*, 252.
6. Langer, M.; Reck, G.; Reed, J.; Rétey, J., *Biochemistry* **1994**, *33*, 6462
7. Hanson, K. R.; Havir, E. A., *The Biochemistry of Plants* **1981**, *7*, 577.
8. Schulz, W.; Eiben, H. G.; Hahlbrock, K., *FEBS Lett.* **1989**, *258*, 335.
9. Schwede, T. F.; Rétey, J.; Schulz, G. E., *Biochemistry* **1999**, *38*, 5355.
10. Örmö, M.; Cubitt, A. B.; Kallio, K.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y.; Remington, S. J., *Science* **1996**, *273*, 1392.
11. Luebke, K.J., *Chem. & Biol.* **1998**, *5*, 317.
12. Palm, G. J.; Zdanov, A.; Gaitanaris, G. A.; Stauber, R.; Pavlakis, G. N.; Wlodawer, A., *Nature Structural Biology* **1997**, *4*, 361.
13. Smith, T. A.; Cordelle, F. H.; Abeles, R. H., *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *120*, 724.
14. Schuster, B.; Rétey, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *95*, 8433.
15. Rétey, J., *Naturwissenschaften*, **1996**, *83*, 439.
16. Gloge, A.; Langer, B.; Poppe, L.; Rétey, J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1998**, *359*, 1.
17. Gloge, A.; Zón, J.; Kővári, Á.; Poppe, L.; Rétey, J., *Chemistry An European Journal*, **2000**, közlésre béküldve.
18. PC Spartan Pro: Wawefunction, Inc., 18401 Von Karman, Suite 370, Irvine, CA 92612, USA.
19. Swiss-PdbViewer, 3.51: Guex, N.; Peitsch, M. C., *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2714-2723.
20. Hermes, J. D.; Weiss, P. M.; Cleland, W. W., *Biochemistry*, **1985**, *24*, 2959.
21. Poppe, L.; Stupperich, E.; Buckel, W.; Rétey, J.: Enzimmechanizmus vizsgálatok B₁₂-koenzim analogonokkal: Új eredmények, *Vegyészkonferencia*, **1999**. június 22-25., Eger, Magyarország.
22. Lenhart, P. G., *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, **1968**, *45*, 303.
23. Poppe, L.; Hull, W. E.; Rétey, J., *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 2367.
24. Summers, M. F.; Marzilli, L. G.; Bax, A., *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4285.
25. Poppe, L.; Rétey, J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1995**, *316*, 541.
26. Poppe, L.; Rétey, J.: Kinetic Investigation of Posthomolysis Analogues of Coenzyme-B₁₂. Inhibition Studies on (R)-Methylmalonyl Mutase and Glycerol Dehydratase, *Minisymposium on Coenzyme-B₁₂*, **1995**. szeptember 9-10, Marburg, Németország.
27. Poppe, L.; Bröker, G.; Bothe, H.; Stupperich, E.; Buckel, W.; Rétey, J.: Recent Investigations of Coenzyme-B₁₂ dependent Mutases with Synthetic B₁₂ Analogues, *TMR Minisymposium on Coenzyme-B₁₂*, **1998**. december 5-6., Karlsruhe, Németország.
28. Poppe, L.; Rétey, J., *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *245*, 398.

29. Poppe, L.; Röther, D.; Stupperich, E.; Rétey, J.: Mapping the Active Site Topology of Ethanolamine Ammonia-Lyase by Kinetic Studies with Coenzyme-B₁₂ Analogues, *TMR Minisymposium on Coenzyme-B₁₂*, 1997. november 1-2, Bern, Svájc.
30. Poppe, L.; Röther, D.; Rétey, J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, közlésre előkészítve.
31. Suto, R. K.; Poppe, L.; Rétey, J.; Finke, R. G., *Bioorg. Chem.* 1999, 27, 451.
32. Poppe, L.; Stupperich, E.; Hull, W. E.; Buckel, T.; Rétey, J., *Eur. J. Biochem.*, 1997, 250, 303.
33. Drennan, C. L.; Huang, S.; Drummond, J. T.; Matthews, R. G.; Ludwig, M. L., *Science*, 1994, 266, 1669.
34. Bax, A.; Marzilli, L. G.; Summers, M. F., *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 566.
35. Poppe, L.; Bothe, H.; Bröker, G.; Buckel, W.; Stupperich, E.; Rétey, J., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1999, közlésre elfogadva.
36. Mancina, F.; Evans, P. R., *Structure*, 1998, 6, 711.
37. Poppe, L.; Evans, P.: Computer Aided Study on Synthetic Coenzyme-B₁₂ Analogues, *TMR Minisymposium on Coenzyme-B₁₂*, 1998. május 2-3, Newcastle, Anglia.
38. Poppe, L.; Bröker, G.; Bothe, H.; Stupperich, E.; Buckel, W.; Rétey, J.: Recent Investigations of Coenzyme-B₁₂ dependent Mutases with Synthetic B₁₂ Analogues, *TMR Minisymposium on Coenzyme-B₁₂*, 1998. december 5-6., Karlsruhe, Németország.
39. Poppe, L.; Hull, W. E.; Nitsche, R.; Graf, T.; Stupperich, E.; Rétey, J., *Helv. Chim. Acta*, 1999, 82, 1250.
40. Evans, P.; Poppe, L.; Rétey, J., 1997, nem közölt adatok.
41. Poppe, L., Synthetic B₁₂-analogues for Investigation of CoB₁₂ dependent enzymes, *TMR Minisymposium on Coenzyme-B₁₂*, 1999. június 19-20., Budapest, Magyarország.
42. Kövári, Á., Torma, A., Poppe, L., Computer studies on substrate-adenosin type B₁₂ inhibitors. *TMR Minisymposium on Coenzyme-B₁₂*, 1999, november 27-28., Graz, Ausztria.
43. Torma, A., Kövári, Á., Poppe, L., Synthesis of substrate-adenosin type B₁₂ inhibitors. *TMR Minisymposium on Coenzyme-B₁₂*, 1999, november 27-28., Graz, Ausztria.